



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

Caracterización molecular de un nuevo nepovirus encontrado en papa (*Solanum tuberosum* L.) mediante la tecnología de secuenciación profunda (*Deep Sequencing*)

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología
Molecular

AUTOR

Joao Adhemir DE SOUZA PACHECO

ASESORES

Dr. Enrique Walter MAMANI ZAPANA

PhD. Jan Frederik KREUZE ROCKSTRÖM (Coasesor)

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

De Souza, Joao. (2020). *Caracterización molecular de un nuevo nepovirus encontrado en papa (Solanum tuberosum L.) mediante la tecnología de secuenciación profunda (Deep Sequencing)*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor	https://orcid.org/0000-0002-3739-3122
DNI o pasaporte del autor	41436466
Código ORCID del asesor	https://orcid.org/0000-0003-4127-1248
DNI o pasaporte del asesor	02414092
Grupo de investigación	—
Agencia financiadora	País de la agencia financiadora Nombre y siglas de la agencia financiadora Nombre del programa financiero Número de contrato
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	Lugar: Centro Internacional de la Papa Perú, Lima, Lima, La Molina, Avenida La Molina 1895. Coordenadas geográficas: Latitud: -12.0778423 Longitud: -76.9469574
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2 años (2014-2015)
Disciplinas OCDE	Bioinformática http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.02.03 Virología http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.02 Bioquímica, Biología molecular http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 162-UPG-FCB-2018

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

Siendo las... 16:0 horas del día 20 de enero de 2020 en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado de Tesis presidido por:

Dra. Libertad Alzamora Gonzales	e integrado por
Dr. Enoc Efer Jara Peña	(Miembro)
Mg. Gustavo Adolfo Sandoval Peña	(Miembro)
Dr. Jorge Luis Rodríguez Malaver	(Miembro)
Dr. Enrique Walter Mamani Zapana	(Asesor)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara el Bachiller Don **JOAO ADHEMIR DE SOUZA PACHECO**.

Después de darse lectura al Expediente N° 162-UPG-FCB-18, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, recepcionaron la exposición de la Tesis Titulada:

"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN NUEVO NEPOVIRUS ENCONTRADO EN PAPA (*Solanum tuberosum* L.) MEDIANTE LA TECNOLOGÍA DE SECUENCIACIÓN PROFUNDA (*Deep Sequencing*)", y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de:

May Bueno con la nota 18



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú. Decana de América

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO



UNIDAD DE POSGRADO

A continuación la Presidente del Jurado de Tesis recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Magíster en Biología Molecular al señor Bachiller Don **JOAO ADHEMIR DE SOUZA PACHECO**.

Siendo las 17:40 se levantó la Sesión, recibiendo el graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, a los 20 días del mes de enero del año 2020.

Dra. Libertad Alzamora Gonzales
Profesora Principal a D. E.
PRESIDENTE
RENACYT N° P000235

Dr. Enrique W. Mamani Zapana
Profesor Principal a D. E.
ASESOR
RENACYT N° P0002206

Dr. Enoc Efer Jara Peña
Profesor Principal a D. E.
MIEMBRO
RENACYT N° P0001551

Mg. Gustavo a. Sandoval Peña
Profesor Asociado a T. C.
MIEMBRO
RENACYT N° P0001316

Dr. Jorge L. Ramirez Malaver
Profesor Auxiliar a T.C.
MIEMBRO
RENACYT N° P0010190

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi gratitud a los que con su valioso aporte académico, profesional y aliento constante contribuyeron en la realización de este trabajo de investigación.

A mis padres Jorge y Yolanda, quienes con su constante apoyo y empuje me motivaron a avanzar en mi carrera y a asumir nuevos retos. A mi esposa, Gianina Cuya, por ser mi apoyo, además de ser partícipe de inicio a fin en la aventura en la maestría.

Quisiera agradecer al Centro Internacional de la Papa por haberme brindado la oportunidad de desarrollar esta (otra) tesis en sus instalaciones. Las gracias a la Biol. Giovanna Müller, por la oportunidad y confianza para realizar la presente tesis bajo su tutela. Al Dr. Jan Kreuze y al M.Sc. Segundo Fuentes, de quienes recibí tantas enseñanzas y consejos para ser un mejor profesional.

Agradezco a todo el personal supervisor, técnico y científico del área de virología del CIP.

Mi gratitud especial para los miembros del Jurado de Tesis por sus valiosas sugerencias y a mi asesor, el Dr. Enrique Mamani, gracias infinitas por sus acertados consejos y apoyo constante.

DEDICATORIA

Con mucho amor, aprecio y respeto a mis queridos
padres Jorge y Yolanda, cuyos ejemplos de lucha y
trabajo constante me guían e impulsan siempre.

A mi hermano Coqui, por su tiempo para la
discusión de comics

A mi abuela Helder, por sus oraciones.

A mi amada esposa, Gianina Cuya, por estar
siempre a mi lado en todo momento, hasta en los
más difíciles

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 La papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....	3
2.2 Virus de plantas	3
2.3 Virus que infectan a la papa.....	4
2.4 Síntomas virales	5
2.4.1. Efectos sobre el tamaño de la planta	6
2.4.2. Patrones de mosaico y síntomas relacionados	7
2.4.3. Amarillamiento	8
2.4.4. Enrollamiento de hojas.....	9
2.4.5. Enfermedades de la mancha anular	10
2.4.6. Necrosis	11
2.4.7. Anormalidades del desarrollo	12
2.4.8. Marchitamiento.....	13
2.5. Transmisión de virus de plantas.....	14
2.5.1. Transmisión de virus por propagación vegetativa:	14
2.5.2. Transmisión mecánica de virus a través de la savia:	14
2.5.3. Transmisión por semillas:	16
2.5.4. Transmisión por polen:	16
2.5.5. Transmisión por insectos:	17
2.5.6. Transmisión por ácaros:	18
2.5.7. Transmisión por nematodos:.....	19
2.5.8. Transmisión por hongos:.....	20
2.6. Género <i>Nepovirus</i>	20

2.7.	Diagnóstico de virus de plantas	23
2.7.1.	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	24
2.7.2.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	27
2.7.3.	Métodos de amplificación isotérmica y detección en campo	30
2.7.4.	Métodos Múltiples (Multiplexing)	34
2.7.5.	<i>Next generation sequencing</i> en diagnóstico viral	35
3.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	38
3.5.	Hipótesis	38
3.6.	Objetivos.....	38
3.2.1.	Objetivo general	38
3.2.2.	Objetivos específicos	38
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	39
4.1.	Lugar de ejecución.....	39
4.2.	Material biológico	39
4.3.	DAS-ELISA	39
4.4.	Extracción de ARN.....	40
4.5.	Preparación de los ARN pequeños de interferencia	41
4.6.	Secuenciación profunda (<i>deep sequencing</i>)	41
4.7.	Análisis de secuencia de ARNpi	42
4.8.	Unión de <i>contigs</i> mediante RT-PCR	43
4.9.	Clonamiento y secuenciamiento	44
4.10.	Ensamblaje de secuencias	45
4.11.	Análisis filogenético	45
4.12.	Validación.....	46
5.	RESULTADOS.....	48
6.	DISCUSIÓN	56
7.	CONCLUSIONES	63
IX.	RECOMENDACIONES	64
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
XI.	ANEXOS	77

11.1. ANEXO 1	77
11.2. ANEXO 2	78
11.3. ANEXO 3	79
11.4. ANEXO 4	80
11.5. ANEXO 5	83
11.6. ANEXO 6	85

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Relación de cebadores utilizados para amplificar el genoma del nuevo nepovirus detectado en la muestra de papa procedente del centro poblado de Quichas.....	44
Tabla 2. Especies del género <i>Nepovirus</i> utilizados para el estudio de filogenia. ...	46
Tabla 3. Matriz de identidad (en porcentaje) de secuencias de aminoácidos de las regiones Pro-Pol y CP.....	52
Tabla 4. Coordenadas de las localidades de las muestras evaluadas y el número de muestras positivas para Potato virus B por sitio.	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas de enanismo de intensidad variable ocasionado por <i>Barley yellow dwarf virus</i> en cebada	7
Figura 2. Mosaico en la hoja de calabaza amarilla y cambio de color e hinchazón en su fruto causada por <i>Zucchini yellow mosaic virus</i>	8
Figura 3. Síntomas de amarillamiento	9
Figura 4. Plantas de papa que muestran enrollamiento en las hojas debido a una infección por <i>Potato leafroll virus</i> (PLRV).	10
Figura 5. Manchas anulares en el fruto del papayo causadas por <i>Papaya ringspot virus</i> (PRSV).	11
Figura 6. Síntomas de mosaico foliar y necrosis en la papa causados por la cepa necrótica de <i>Potato virus Y</i> (PVY).	12
Figura 7. Síntomas de anormalidades en el crecimiento de la planta.	13
Figura 8. Marchitamiento ocasionado por <i>Citrus tristeza virus</i> (CTV)	13
Figura 9. Transmisión de virus a través de propagación vegetativa, injertos naturales y por la planta parásita cúscuta.	14
Figura 10. Pasos típicos en la transmisión mecánica en virus de plantas.....	15
Figura 11. Transmisión de virus de plantas mediante contacto directo de plantas, semilla y polen.	16
Figura 12. Insectos vectores de virus de plantas.	19
Figura 13. Transmisión de virus de plantas por nematodos, ácaros y hongos. Adaptada de.....	20
Figura 14. Ubicación del centro poblado de Quichas [departamento de Pasco (Perú)].....	39
Figura 15. Pasos de secuenciación a gran escala procesados por Illumina	42
Figura 16. <i>Pipeline</i> bioinformático	47

Figura 17. Organización genómica de PVB. Representación esquemática de la organización genómica del virus	50
Figura 18. Gráfico de líneas de RNApi	51
Figura 19. Árboles filogenéticos de miembros del género <i>Nepovirus</i> basado en las secuencias de aminoácidos de la (18a) región Pro-Pol y (18b) región CP.	53
Figura 20. Árbol filogenético construido con la región de la polimerasa amplificada de los aislados de PVB	54
Figura 21. Distribución de muestras positivas y negativas evaluadas para PVB	55

LISTA DE ABREVIATURAS

3' UTR: *Three prime untranslated region* (región 3' no traducida)

5' UTR: *Five prime untranslated region* (region 5' no traducida)

aa: aminoácidos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool* (Herramienta de búsqueda básica de alineación local)

cDNA: ADN complementario

CIP: Centro Internacional de la Papa

CP: *Coat protein* (proteína de cubierta; cápside proteica)

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

HCl: Ácido clorhídrico

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

kb: Kilobase

kDa: Kilodaltons

MgCl₂: Cloruro de Magnesio

MP: Proteína de movimiento

NGS: *Next generation sequencing* (secuenciamiento de próxima generación)

nts: nucleótidos

ppm: partes por millón

TRIS-HCl: Tris(hydroxymethyl)aminomethane - HCl

UTR: *Untranslate regions* (regiones no traducidas)

X-Gal: bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside

μ L: microlitro

μ g: microgramo

RESUMEN

Se obtuvo el genoma bipartito completo (ARN1 y ARN2) de un nuevo nepovirus que infecta a la papa, utilizando la secuenciación y ensamblaje de ARN pequeños, a lo que se le complementó con la secuenciación de Sanger. El ensamblaje de las secuencias para el ARN1 dio 7154 nts y para el ARN2 4527 nts, excluyendo la cola poli A. Cada ARN codifica para una sola poliproteína, flanqueada por regiones 5' y 3' no traducidas (UTR), esta última seguida por una cola poli A. Las poliproteínas codificadas por el ARN1 y el ARN2 tienen conjuntos de motivos que son característicos de virus en el género *Nepovirus*. Se encontró que la poliproteína del ARN1 tiene los dominios para una helicasa, una proteína de unión al genoma viral, una proteinasa y una ARN polimerasa dependiente de ARN. Por otro lado, la poliproteína del ARN2 tiene los dominios para la proteína de movimiento y para la cubierta proteica. Las comparaciones de secuencias usando la región Pro-Pol y la proteína de la cubierta, incluido el análisis filogenético de estas regiones, mostraron relaciones más cercanas con los nepovirus (71% y 34% de identidad en aminoácidos, respectivamente). Los datos obtenidos apoyan el estado taxonómico de este nuevo virus (llamado tentativamente Potato virus B, PVB) como miembro del género *Nepovirus*, subgrupo B.

Palabras Clave: Papa, *deep sequencing*, RT-PCR, nepovirus, Potato virus B

ABSTRACT

The complete bipartite genome (RNA1 and RNA2) of a new nepovirus infecting potato was obtained using small RNA sequencing and assembly complemented by Sanger sequencing. The assembly of the sequences for RNA1 gave 7154nts and for RNA2 4527nts, excluding the poly A tail. Each RNA encodes a single polyprotein, flanked by 5' and 3' untranslated regions (UTR), the last one followed by a poly A tail. The polyproteins encoded by RNA1 and RNA2 had sets of motifs which are characteristic of viruses in the genus *Nepovirus*. It was found that the polyprotein of RNA1 has the domains for a helicase, a viral genome binding protein, a proteinase and an RNA-dependent RNA polymerase. On the other hand, the polyprotein of RNA2 has the domains for the movement protein and for the coat protein. Sequence comparisons using the Pro-Pol region and the coat protein, including phylogenetic analysis of these regions, showed closest relationships with nepoviruses (71% and 34% amino acid identity, respectively). The data obtained support the taxonomical status of this new virus (putative named Potato virus B, PVB) as a member of the genus *Nepovirus*, subgroup B.

Key words: Potato, *deep sequencing*, RT-PCR, nepovirus, Potato virus B

I. INTRODUCCIÓN

La papa es un alimento básico en algunas partes del mundo con climas templados o climas más frescos a gran altura en las regiones tropicales. La papa se caracteriza por ser un cultivo de regiones frías, templadas o de altas elevaciones (por arriba de 1000 msnm) en los trópicos. Las papas cultivadas se clasifican en un número de especies e híbridos que pertenecen a la familia *Solanaceae*, sección *Tuberosum*. En el mundo entero, la papa cultivada más comúnmente sembrada es el tetraploide *Solanum tuberosum* L., el cual es dividido en dos subgrupos de cruce completamente fértiles (*Tuberosum* y *Andigena*) o dos subespecies (*tuberosum* y *andigena*). *Solanum tuberosum* subgrupo *Andigena* es más ampliamente sembrada en Sudamérica y generalmente crece mejor en días cortos de regiones cercanos al Ecuador (Stevenson *et al.*, 2001).

Es bien conocido el efecto de los virus en el cultivo de la papa ya que su control ha tenido siempre una alta prioridad. Debido a que las enfermedades virales solo pueden ser efectivamente controladas por métodos preventivos, los programas de producción de semilla libre, o con bajo nivel de contaminación, resultan imprescindibles. Aun cuando un programa de semillas no solamente tiene como objetivo el control de las enfermedades virales, éstas representan uno de sus objetivos principales. Un programa eficiente de producción de tubérculo-semilla requiere de una tecnología también eficiente para la detección de enfermedades, especialmente virales. En el mundo, los principales virus que afectan a la papa son: PLRV (*Potato leafroll virus*, género *Polerovirus*), PVY (*Potato virus Y*, género *Potyvirus*), PVA (*Potato virus A*, género *Potyvirus*) y PVX (*Potato virus X*, género *Potexvirus*); sumándose a éstos, en los países andinos, PVS (*Potato virus S*, género *Carlavirus*) y PYVV (*Potato yellow vein virus*, género *Crinivirus*) (Salazar, 1995; Salazar, 1997). El efecto del PLRV en variedades susceptibles puede llegar a ocasionar pérdidas de hasta el 90%, mientras que PVY y PYVV pueden reducir los rendimientos hasta en 80% y 60%, respectivamente. La utilización sucesiva de tubérculo semilla por parte de los agricultores conduce al aumento de los niveles de incidencia y severidad de estos virus y de otros no incluidos en el programa de certificación, generando reducciones importantes en la producción de este cultivo.

Entre los virus no incluidos se destacan el PMTV (*Potato mop-top virus*, género *Pomovirus*), que según Salazar (2006), está distribuido en todos los Andes suramericanos, desde Venezuela hasta Bolivia, pero no induce la sintomatología clásica reportada en la zona templada y por tanto tiende a ser confundido con otros problemas virales o incluso con problemas abióticos.

El género *Nepovirus* (orden *Picornavirales*, familia *Secoviridae*, subfamilia *Comovirinae*) es un género de virus de plantas que se han dividido en tres subgrupos (A, B, C) en función de la longitud y el encapsulado de su respectivo ARN 2, a sus propiedades serológicas, a la especificidad del sitio de corte de la proteinasa, y al análisis filogenético de la secuencia de la proteína de cubierta (Sanfaçon, 2009; Sanfaçon, 2012). Existen pocos nepovirus que infectan a la papa. En el subgrupo A, hay informes de *Tobacco ringspot virus* (TRSV) (Fribourg, 1977) y *Potato black ring spot virus* (PBRSV) (Salazar y Harrison, 1977); sin embargo, un informe reciente (Richards *et al.*, 2013) confirma que la cepa cálico de TRSV, la única cepa de TRSV reportada que infecta papa (Fribourg, 1977), es en realidad una cepa de PBRSV, confirmando lo reportado por Salazar y Harrinson (1978). Según esto, no existirían informes que TRSV realmente infecte a la papa. En el subgrupo C, el único virus reportado que infecta a la papa es *Potato virus U* (PVU), pero no hay información de la secuencia que pueda confirmar su ubicación. En el subgrupo B, sólo hay un reporte de *Tomato black ring virus* (TBRV), pero ésta se dio en Europa. La infección de PBRSV en la papa normalmente es esporádica, y dicho virus se considera de poca importancia en este cultivo (Jones *et al.*, 2009).

En este estudio, se secuenció el genoma completo de un nuevo nepovirus del subgrupo B que infecta a la papa en América del Sur basado en *contigs* producidos por secuenciación profunda (*deep sequencing*) de siRNA (Fuentes *et al.*, 2012; Kreuze *et al.*, 2013; De Souza *et al.*, 2013); y utilizando luego la secuenciación de Sanger para completar los espacios entre los *contigs*. Posteriormente se procedió con el análisis de dicho genoma. El virus en estudio se denominó de manera tentativa como Potato virus B (PVB).

II. ANTECEDENTES

2.1 La papa (*Solanum tuberosum* L.)

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es el tercer cultivo alimentario más importante a nivel mundial en términos de consumo humano y tiene un alto valor nutricional (FAOSTAT, 2013; CIP, 2016). Actualmente, la papa se cultiva en más de 150 países en un área estimada de 194 000 hectáreas en tierras agrícolas, con una producción de más de 368 millones de toneladas de tubérculos por año (FAOSTAT, 2013). La papa se adapta a una amplia gama de zonas climáticas, incluidas las zonas templadas, subtropicales y tropicales, y se cultiva bajo diversas condiciones agroeconómicas (Struik y Wiersema, 1999). Más de la mitad de la producción mundial de papa se encuentra en países en desarrollo, convirtiéndola en una fuente importante de alimentos e ingresos para millones de pequeños agricultores.

2.2 Virus de plantas

Un virus es un *set* de uno o más moléculas de ácido nucleicos, normalmente encerradas en una cubierta protectora o cubiertas de proteína o lipoproteína, que es capaz de organizar su propia replicación sólo dentro de la célula huésped adecuada. Dentro de tales células, la replicación del virus es: (1) dependiente de la maquinaria de síntesis de proteína del hospedero, (2) organizado en grupos de los materiales requeridos por fisión binaria, (3) localizado en sitios que no están separados de los contenidos celulares por una membrana de bicapa de lipoproteína y (4) continuamente da lugar a variantes a través de varios tipos de cambios en el ácido nucleico viral (Hull, 2009).

Los virus de plantas son patógenos de plantas importantes económicamente y muy dispersos. Virtualmente, todas las plantas que los humanos cultivan para alimento propio, alimento de ganado y fibra son afectados por al menos un virus. Los virus que afectan a las plantas cultivadas son estudiados debido al impacto económico sobre la producción. Sin embargo, también es importante reconocer que muchas plantas silvestres son también hospederos de virus. Aunque los virus de plantas no tienen un impacto inmediato en humanos a la medida que los virus de humanos lo hacen, el daño que estos causan en los alimentos tiene un efecto indirecto importante (Hull, 2009).

La papa es un hospedero natural para los miembros de más de 30 especies de virus pertenecientes a alrededor de 18 géneros (Salazar, 1996). A la fecha, 8 son los principales agentes patógenos que causan graves daños en este cultivo, pero existen varios virus que se encuentran sólo en Latinoamérica y tienen importancia local (Kerlan, 2009); sin embargo, es necesario considerar los ensayos de rendimiento necesarios para conocer la importancia real que estos virus pueden producir.

Se conoce que un cultivo puede ser infectado por muchos virus, así como también que es importante el estudio de los virus para conocer su distribución e incidencia de los mismos. Para ello, el primer paso es determinar cuál o cuáles virus están afectando a un determinado cultivo, por lo que se necesita disponer/desarrollar métodos para su detección. Dicha metodología ayuda a producir material libre de virus, hacer comparaciones del material sano e infectado en campo, determinar la tasa de reinfección, la distribución e incidencia viral, etc (Kerlan, 2009).

2.3 Virus que infectan a la papa

Como la mayoría de los cultivos propagados vegetativamente, la papa sufre de muchas enfermedades virales. Estos virus son de dos tipos principales:

- (1) aquellos que infectan principalmente a la papa y
- (2) aquellos que infectan predominantemente otras plantas.

El primer grupo probablemente coevolucionó con especies de papa silvestre en el centro de origen del cultivo. Parte del segundo grupo solo se extendió a la papa cuando se introdujo en las regiones del mundo en que se producen. Las enfermedades del virus de la papa han sido objeto de intensos estudios e investigaciones a lo largo del siglo XX debido a la considerable importancia económica que algunos virus individuales tienen para causar la degeneración del cultivo. El control de estos virus requiere medidas costosas que incluyen programas de propagación de semillas saludables, controles fitosanitarios y culturales, cultivares resistentes a la reproducción, uso de productos químicos contra vectores, etc. (Jones *et al.*, 2009)

Se han descrito al menos 38 virus en papa, varios de ellos clasificados por ICTV (del inglés *International Committee on Taxonomy of Viruses*) como especies provisionales o posibles cepas de una especie (King *et al.*, 2012). Se pueden dividir en tres grupos según su importancia y su distribución en las áreas productoras de papa en el mundo, incluyendo en total a virus bien conocidos y virus descubiertos recientemente, a menudo poco caracterizados (Kerlan, 2009).

El primer grupo incluye ocho virus, los cuales son los principales patógenos que causan daños severos en los cultivos de papa; estos son: *Potato virus Y* (PVY, *Potyvirus*), *Potato leafroll virus* (PLRV, *Polerovirus*), *Potato virus X* (PVX, *Potexvirus*), *Potato virus A* (PVA, *Potyvirus*), *Potato virus S* (PVS, *Carlavirus*), *Potato virus M* (PVM, *Carlavirus*), *Tobacco rattle virus* (TRV, *Tobravirus*), *Potato mop-top virus* (PMTV, *Pomovirus*) (Kerlan, 2009).

En el segundo grupo se encuentran muchos virus que infectan papa, los cuales se encuentran sólo en América Latina; sin embargo, ninguno de estos es económicamente importante; incluso algunos de ellos se han encontrado solo una vez en un cultivar. Algunos ejemplos de estos virus son: *Andean potato latent virus* (APLV, *Tymovirus*), *Andean potato mottle virus* (APMoV, *Comovirus*), *Potato virus P* (PVP, *Carlavirus*), *Potato virus T* (PVT, *Trichovirus*), *Potato virus U* (PVU, *Nepovirus*), *Potato yellow mosaic virus* (PYMV, *Begomovirus*), *Potato yellow vein virus* (PYVV, *Crinivirus*), *Tobacco ringspot virus* (TRSV, *Nepovirus*) (Kerlan, 2009).

El tercer grupo comprende virus que se producen en otras partes del mundo y tienen importancia local o no tienen ninguna. Algunos ejemplos son: *Alfalfa mosaic virus* (AMV, *Alfamovirus*), *Cucumber mosaic virus* (CMV, *Cucumovirus*), *Potato aucuba mosaic* (PAMV, *Potexvirus*), *Potato latent virus* (PotLV, *Carlavirus*), *Potato virus V* (PVV, *Potyvirus*), *Tobacco necrosis virus* (TNV, *Necrovirus*), *Tobacco streak virus* (TSV, *Ilarvirus*), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV, *Tospovirus*) (Kerlan, 2009).

2.4 Síntomas virales

Los virus generalmente acortan la vida útil de las plantas infectadas con virus, aunque rara vez matan a las plantas en la infección. Estos efectos pueden ser severos y llamativos o pueden ser muy leves y fácilmente pasados por alto (Agrios,

2005). Los síntomas más obvios de las plantas infectadas por virus suelen ser los que aparecen en las hojas, pero algunos virus pueden causar síntomas notables en el tallo, la fruta y las raíces, mientras que pueden o no causar el desarrollo de síntomas en las hojas.

En casi todas las enfermedades virales de las plantas que ocurren en el campo, el virus está presente en toda la planta (infección sistémica) e induce la formación de síntomas sistémicos. En muchas plantas inoculadas artificialmente con ciertos virus, el virus causa la formación de lesiones pequeñas, cloróticas o necróticas solo en los puntos de entrada (infecciones locales), y los síntomas se denominan lesiones locales. Sin embargo, muchos virus infectan ciertas zonas sin causar el desarrollo de síntomas visibles en ellos. Tales virus generalmente se denominan virus latentes y los huéspedes se denominan portadores sin síntomas. Sin embargo, en otros casos, las plantas que generalmente desarrollan síntomas en la infección con un determinado virus pueden permanecer temporalmente sin síntomas bajo ciertas condiciones ambientales (por ejemplo, temperatura alta o baja), y estos síntomas se denominan enmascarados (Agrios, 2005). Los síntomas más reconocibles son:

2.4.1. Efectos sobre el tamaño de la planta

La reducción en el tamaño de la planta es el síntoma más general inducido por la infección por virus. El grado de retraso en el crecimiento generalmente se correlaciona con la gravedad de otros síntomas, particularmente cuando se trata de la pérdida de clorofila de las hojas (Figura 1). El retraso en el crecimiento generalmente se debe casi por completo a la reducción del tamaño de la hoja y la longitud del entrenudo. El número de hojas puede verse poco afectado (Hull, 2009).



Figura 1. Síntomas de enanismo de intensidad variable ocasionado por *Barley yellow dwarf virus* en cebada. Foto tomada de Agrios (2005).

2.4.2. Patrones de mosaico y síntomas relacionados

Uno de los efectos más comunes de la infección por virus es el desarrollo de un patrón de áreas verdes claras y oscuras, que crea un efecto mosaico en las hojas infectadas (Figura 2). La naturaleza detallada del patrón varía ampliamente para diferentes combinaciones de virus y huésped. Las uniones entre áreas de diferente color pueden ser agudas, y tales enfermedades se parecen bastante a los mosaicos producidos por defectos genéticos heredados en los cloroplastos. En las enfermedades de mosaico que infectan a las plantas herbáceas, generalmente ocurre una secuencia bastante bien definida en el desarrollo de síntomas sistémicos. El virus se mueve desde la hoja inoculada hacia el brote en crecimiento y hacia hojas parcialmente expandidas. Las áreas de mosaico pueden limitarse a la parte más joven de la lámina de la hoja, es decir, la región basal y central. Aunque puede aparecer una variación considerable en las diferentes plantas, las hojas infectadas sistémicamente sucesivamente más jóvenes muestran, en promedio, mosaicos que consisten en menos áreas y más grandes. El patrón de mosaico se establece en una etapa muy temprana del desarrollo de la hoja y puede permanecer sin cambios, a excepción de la ampliación general, durante la mayor parte de la vida de la hoja (Hull, 2009).



Figura 2. Mosaico en la hoja de calabaza amarilla y cambio de color e hinchazón en su fruto causada por *Zucchini yellow mosaic virus*. Foto tomada de Agrios (2005).

2.4.3. Amarillamiento

Foto tomada de Agrios (2005). Los virus que causan un amarillamiento general de las hojas no son tan numerosos como los que causan enfermedades de mosaico, pero algunos, como los virus que causan amarillos en la remolacha azucarera, son de considerable importancia económica. El primer signo de infección suele ser un aclaramiento o coloración amarillenta de las venas en las hojas más jóvenes, seguido de un ennegrecimiento o enrojecimiento general de las hojas (Figura 3a). Este color amarillento puede ser leve o severo. No se produce mosaico, pero en algunas hojas pueden aparecer sectores de tejido amarillento y normal (Hull, 2009). Cuando este síntoma se torna de un amarillo blanquecino de intensidad variable, es conocido como cálico (Figura 3b).



Figura 3. Síntomas de amarillamiento (3a) enfermedad del rayado del plátano producido por *Banana streak virus* (BSV), (3b) síntomas de cálico producido por *Alfalfa mosaic virus* (AMV). Foto tomada de Agrios (2005).

2.4.4. Enrollamiento de hojas

La infección por el virus puede provocar el enrollamiento de la hoja, que generalmente es hacia arriba pero ocasionalmente hacia abajo (Figura 4). La epinastía pronunciada (flexión hacia abajo de las hojas) a veces puede ser una característica prominente (Hull, 2009).



Figura 4. Plantas de papa que muestran enrollamiento en las hojas debido a una infección por *Potato leafroll virus* (PLRV). Foto tomada de Agrios (2005).

2.4.5. Enfermedades de la mancha anular

Las manchas anulares son un patrón de anillos concéntricos y líneas irregulares en las hojas y, a veces, también en el fruto (Figura 5). Las líneas pueden consistir en tejido amarillento o pueden deberse a la muerte de capas superficiales de células, dando una apariencia grabada. En enfermedades graves, puede ocurrir necrosis completa a través del grosor completo de la lámina de la hoja. Los patrones de manchas anulares también pueden ocurrir en otros órganos, como bulbos y tubérculos (Hull, 2009).



Figura 5. Manchas anulares en el fruto del papayo causadas por *Papaya ringspot virus* (PRSV). Foto tomada de Agrios (2005).

2.4.6. Necrosis

La muerte de tejidos, órganos o toda la planta es la característica principal de algunas enfermedades. Los patrones necróticos pueden seguir las venas a medida que el virus se mueve hacia la hoja (Figura 6). La necrosis puede extenderse con bastante rapidez por toda la planta. La necrosis se propaga rápidamente al punto de crecimiento, que se mata, y posteriormente todas las hojas pueden colapsar y morir. El marchitamiento de las partes que están a punto de volverse necróticas a menudo precede a dicha enfermedad necrótica sistémica (Hull, 2009).



Figura 6. Síntomas de mosaico foliar y necrosis en la papa causados por la cepa necrótica de *Potato virus Y* (PVY). Foto tomada de Agrios (2005).

2.4.7. Anormalidades del desarrollo

Además de ser generalmente más pequeñas de lo normal, las plantas infectadas con virus pueden mostrar una amplia gama de anomalías del desarrollo. Tales cambios pueden ser la característica principal de la enfermedad o pueden acompañar a otros síntomas. Por ejemplo, el crecimiento desigual de la lámina de la hoja a menudo se encuentra en las enfermedades del mosaico. Las áreas de color verde oscuro pueden elevarse para dar un efecto de ampollas, y el margen de la hoja puede ser irregular y retorcido (Figura 7a). Los virus pueden causar una variedad de crecimientos similares a tumores. En una planta infectada sistémicamente, los tumores externos aparecen en las hojas o tallos donde se forman las heridas. En las raíces infectadas, aparecen espontáneamente, comenzando el desarrollo cerca de las células del periciclo que están heridas cuando las raíces laterales en desarrollo atraviesan la corteza (Figura 7b). La deformación del tallo, como la división del tallo y la cicatrización, es causada por algunos virus en algunas plantas leñosas (Hull, 2009).

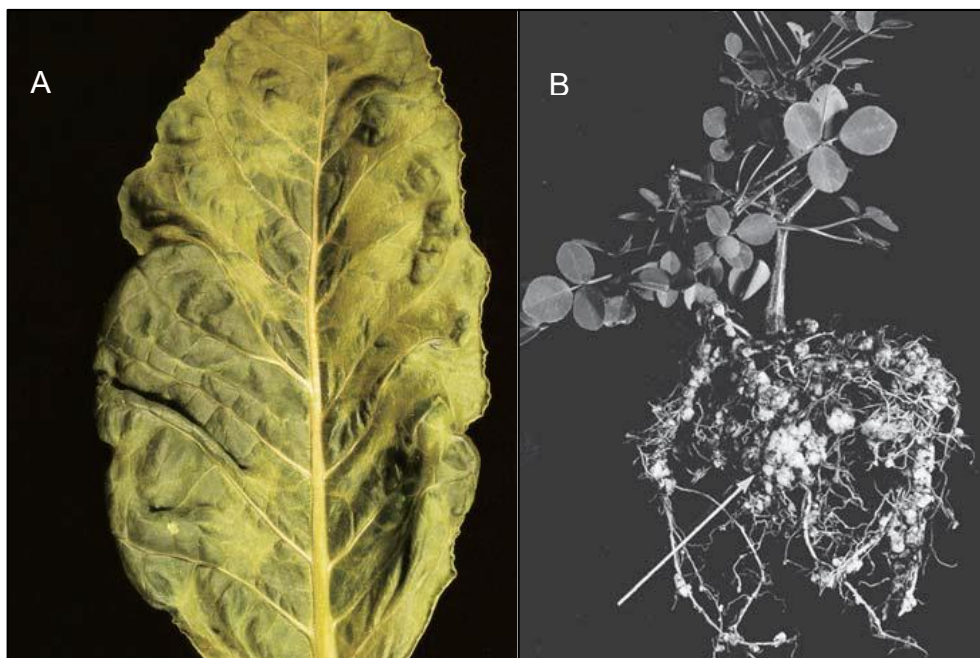


Figura 7. Síntomas de anomalías en el crecimiento de la planta. (7a) Ampollas en hojas de tabaco producidas por *Tobacco mosaic virus* (TMV). (7b) Tumores (agallas) producidos en heridas de raíces de trébol dulce infectadas con *Wound tumor virus* (WTM). Fotos tomadas de Agrios (2005).

2.4.8. Marchitamiento

Algunas infecciones por virus inducen el marchitamiento de las partes aéreas (Figura 8), lo que lleva a la muerte de toda la planta (Hull, 2009).



Figura 8. Marchitamiento ocasionado por *Citrus tristeza virus* (CTV). Foto tomada de Agrios (2005).

2.5. Transmisión de virus de plantas

Los virus vegetales se transmiten de una planta a otra de varias maneras. Los modos de transmisión incluyen la propagación vegetativa, mecánicamente a través de la savia, las semillas, el polen, los insectos, los ácaros, los nematodos y por hongos específicos (Agrios, 2005).

2.5.1. Transmisión de virus por propagación vegetativa:

Los virus se pueden transmitir mediante esta vía siempre que las plantas se propaguen vegetativamente por injerto, por esquejes o por el uso de tubérculos, cormos, bulbos o rizomas, cuando se tomen estos órganos de la planta madre (Figura 9) (Agrios, 2005).

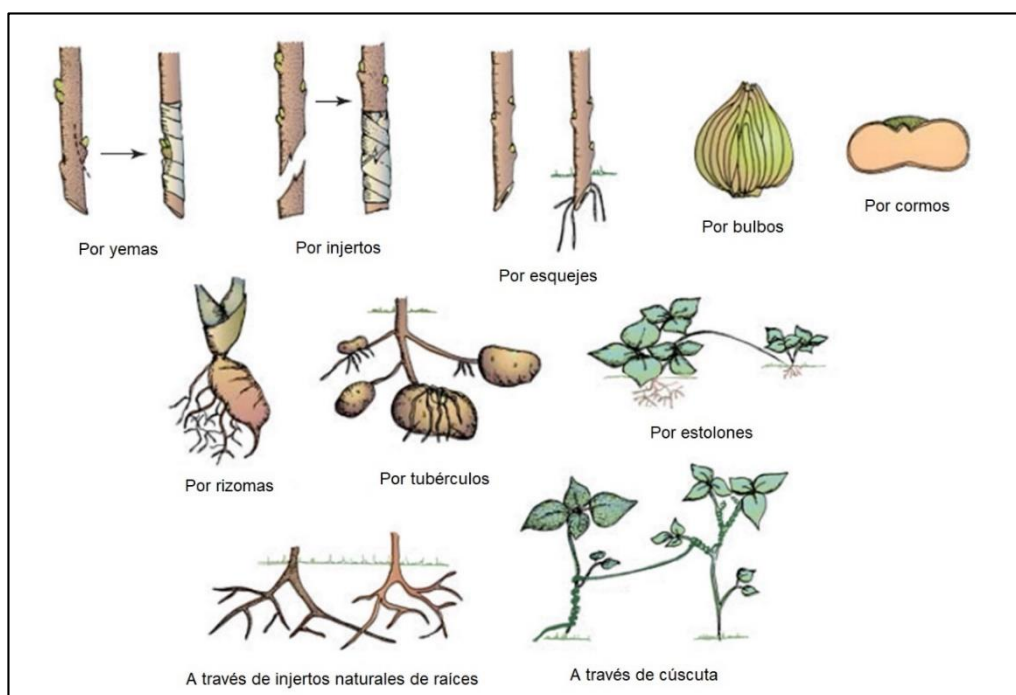


Figura 9. Transmisión de virus a través de propagación vegetativa, injertos naturales y por la planta parásita cúscura. Adaptada de Agrios (2005)

2.5.2. Transmisión mecánica de virus a través de la savia:

La transmisión mecánica en los virus de plantas en la naturaleza mediante la transferencia directa de savia a través del contacto de una planta con otra es poco común y relativamente poco importante. Dicha transmisión puede tener lugar después de que un fuerte viento dañe las hojas de plantas adyacentes enfermas y sanas o cuando las plantas sean heridas durante las prácticas

culturales por herramientas, manos o ropa, o por animales que se alimentan de las plantas, y el virus que transporta la savia se transfiera a plantas heridas. De los virus importantes de la planta, *Potato virus X*, *Tobacco mosaic virus* y *Cucumber mosaic virus* se transmiten a través de la savia en el campo y pueden causar graves pérdidas.

La mayor importancia de la transmisión mecánica de los virus de plantas proviene de su indispensabilidad en el estudio de los virus que causan enfermedades de las plantas (Figura 10). Para la transmisión mecánica de un virus, se muelen hojas jóvenes y pétalos de flores para aplastar las células y liberar el virus en la savia para después inocularlo en plantas jóvenes, principalmente en un rango de plantas indicadoras, las cuales generalmente muestran síntomas más fuertes que en el cultivo de interés.

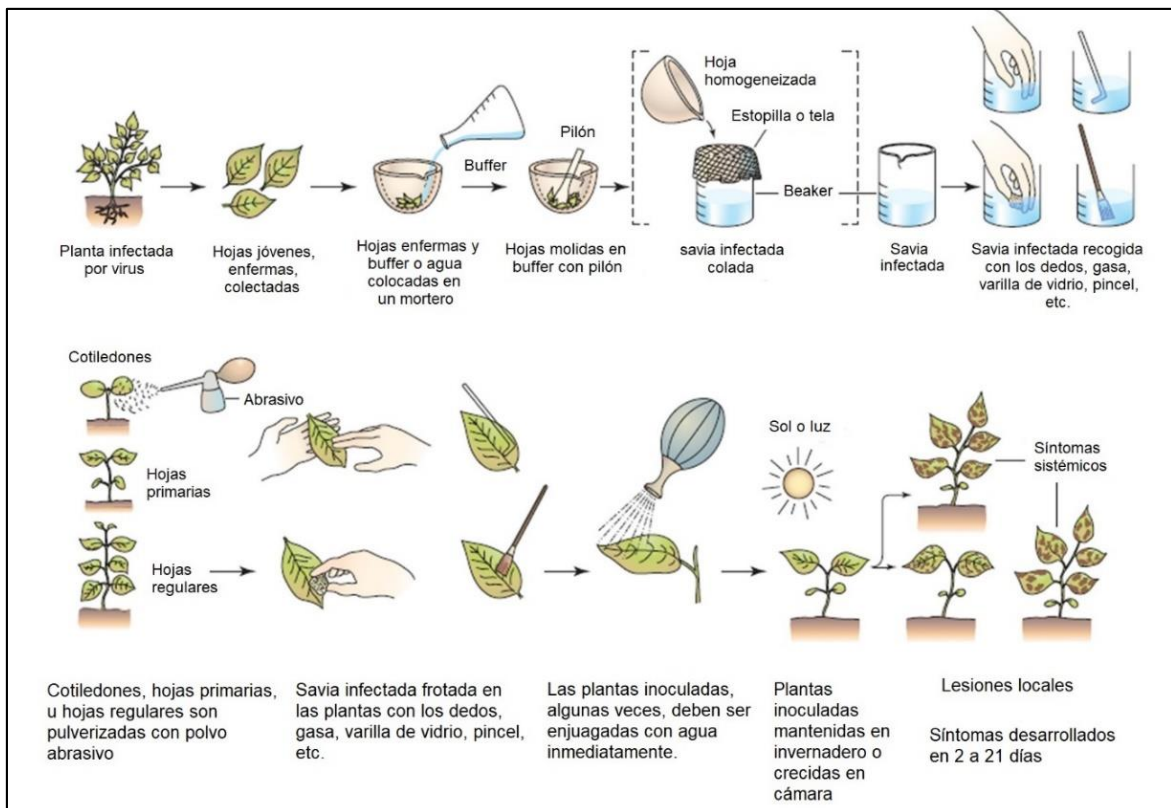


Figura 10. Pasos típicos en la transmisión mecánica en virus de plantas. Adaptada de Agrios (2005)

2.5.3. Transmisión por semillas:

Más de 100 virus son transmitidos a través de semillas botánicas en mayor o menor medida. Como regla general, solo una pequeña porción (1–30%) de semillas derivadas de plantas infectadas con virus de solo algunos huéspedes del virus transmiten el virus. Sin embargo, en algunas combinaciones virus-huésped, la mitad o la mayoría de las semillas son portadoras del virus, y en algunas otras el 100% de las semillas son portadoras del virus. La frecuencia de transmisión varía con la combinación huésped-virus y con la etapa de crecimiento de la planta madre cuando se infecta con el virus (Figura 11) (Agrios, 2005).

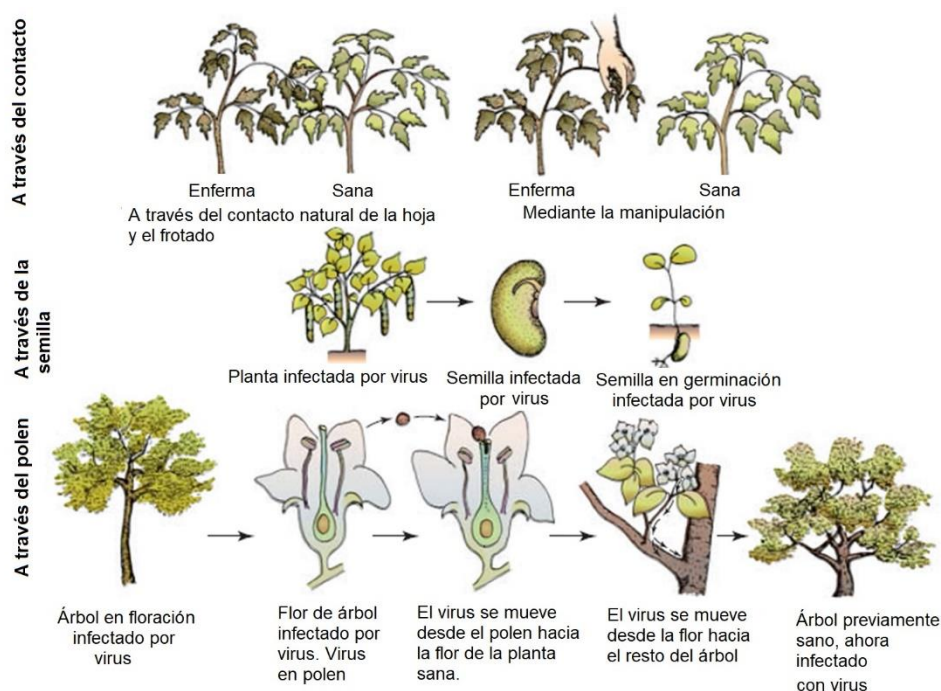


Figura 11. Transmisión de virus de plantas mediante contacto directo de plantas, semilla y polen. Adaptada de Agrios (2005)

2.5.4. Transmisión por polen:

El virus transmitido por el polen puede reducir la producción de frutos, puede infectar la semilla y las plántulas que crecerán de ella y, en algunos casos, puede propagarse a través de la flor fertilizada y hacia la planta madre, que se infecta con el virus (Figura 11). Se sabe que dicha transmisión de virus de planta a planta a través del polen ocurre, por ejemplo, en cereza agria infectada con *Prunus necrotic ring spot virus* (Agrios, 2005).

2.5.5. Transmisión por insectos:

Los insectos vectores son indudablemente el medio más común y económicamente más importante de transmisión de virus en el campo. Sin embargo, los son relativamente pocos grupos de insectos los que pueden transmitir virus vegetales (Figura 12). El orden *Homoptera*, que incluye áfidos (*Aphididae*), cigarritas (*Cicadellidae*) y saltamontes (*Delphacidae*), contiene con mucho el mayor número de los insectos vectores más importantes de los virus de plantas. Otros homópteros que transmiten virus de plantas son las moscas blancas (*Aleurodidae*), que transmiten los geminivirus y crinivirus, las cochinillas (*Coccoidae*) y ciertos saltamontes (*Membracidae*). Algunos insectos vectores de virus de plantas pertenecen a otras órdenes, como los insectos verdaderos (*Hemiptera*), los trips de (*Thysanoptera*) y los escarabajos (*Coleoptera*). Los saltamontes (*Ortópteros*) ocasionalmente parecen portar y transmitir algunos virus también. Los vectores de virus más importantes son los ácaros, los saltahojas, las moscas blancas y los trips. Estos y los otros grupos de homópteros, así como los verdaderos insectos, tienen piezas bucales perforadoras y chupadoras. Los escarabajos y los saltamontes tienen piezas bucales para masticar (Agrios, 2005).

Los insectos con piezas bucales succionadoras portan virus de plantas en sus estilos (virus transmitidos por estiletes) y pueden adquirir e inocular el virus después de cortos períodos de alimentación de unos pocos segundos a unos pocos minutos. Los virus transmitidos por estiletes persisten en el vector por solo unas pocas o varias horas. Por lo tanto, también se conocen como virus no persistentes. Con algunos otros virus, los vectores de insectos deben alimentarse de una planta infectada desde varios minutos u horas hasta algunos días antes de que acumulen suficiente virus para la transmisión. Estos insectos pueden transmitir el virus después de períodos de alimentación bastante largos de varios minutos a varias horas. Tales virus persisten en el vector por unos pocos (1 a 4) días y se denominan virus semipersistentes. Con otros virus, los vectores de insectos acumulan el virus internamente y, después del paso del virus a través de los tejidos del insecto, vuelva a introducir el virus en las plantas a través de sus piezas bucales. Estos virus se conocen como

virus circulantes o persistentes. Algunos virus circulatorios pueden multiplicarse en sus respectivos vectores y luego se denominan virus propagativos. Los virus transmitidos por insectos con piezas bucales masticables (escarabajos) también pueden ser circulatorios o pueden transportarse en las piezas bucales (Agrios, 2005).

Los ácaros son los vectores de insectos más importantes de los virus vegetales y transmiten la gran mayoría (aproximadamente 275) de todos los virus transmitidos por estiletes. Los pulgones generalmente adquieren el virus transmitido por el estilete después de alimentarse de una planta enferma durante solo unos segundos (30 segundos o menos) y pueden transmitir el virus después de la transferencia y alimentarse de una planta sana durante un tiempo similar de unos pocos segundos. El período de tiempo que los pulgones permanecen virulíferos después de la adquisición de un virus transmitido por estiletes varía de unos minutos a varias horas, después de lo cual ya no pueden transmitir el virus. En los ácaros que transmiten virus por estiletes, el virus parece transmitirse en las puntas de los estiletes, se pierde fácilmente a través del lavado que ocurre durante el sondeo de las células huésped y no persiste a través de la muda o el huevo. Se dice que los virus transmitidos por estilete se transmiten de manera no persistente. En los pocos casos de transmisión de pulgones de virus circulatorios, los pulgones no pueden transmitir el virus de inmediato, pero deben esperar varias horas después de la alimentación de adquisición; sin embargo, una vez que comienzan a transmitir el virus, continúan haciéndolo durante muchos días después de la eliminación de los insectos de la fuente del virus (transmisión persistente) (Agrios, 2005).

2.5.6. Transmisión por ácaros:

Principalmente, los ácaros de la familia *Eriophyidae* han demostrado transmitir al menos seis virus, incluido el *Wheat streak mosaic virus* y varios otros rymovirus que afectan a los cereales. Estos ácaros tienen piezas bucales perforadoras y chupadoras. La transmisión del virus por los ácaros eriófidos parece ser bastante específica, ya que cada uno de estos ácaros es el único vector conocido para el virus o los virus que transmite. Otro virus, *Peach mosaic virus*, es transmitido por los ácaros de la familia *Tetranychidae* (Figura 13).

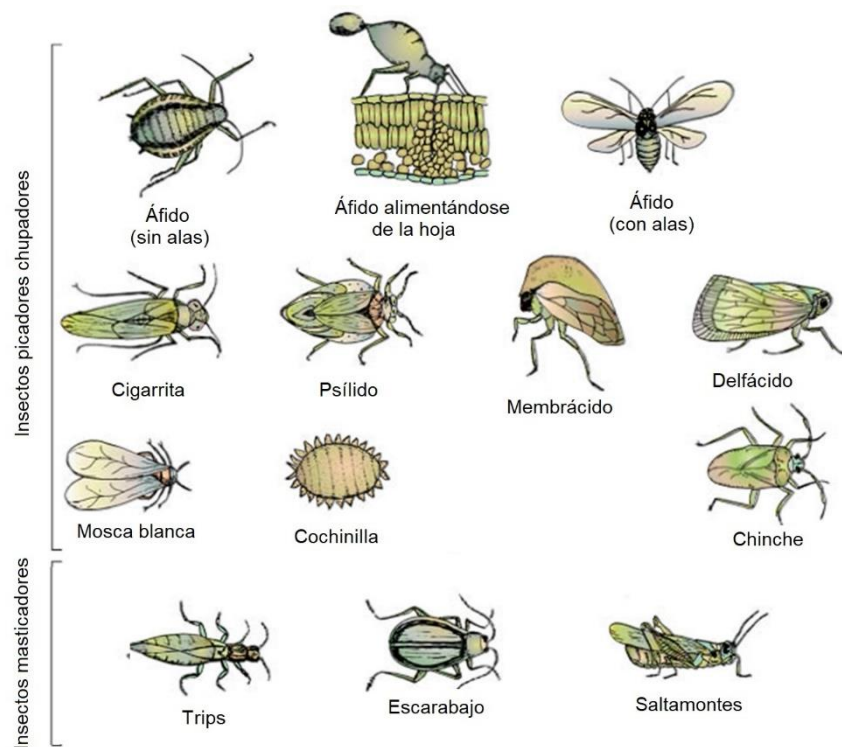


Figura 12. Insectos vectores de virus de plantas. Los insectos en la segunda fila desde la parte superior también transmiten mollicutes y bacterias vasculares fastidiosas. Adaptada de Agrios (2005)

2.5.7. Transmisión por nematodos:

Aproximadamente 20 virus de plantas son transmitidos por una o más especies de tres géneros de nemátodos ectoparasitarios que habitan el suelo. Los nematodos de los géneros *Longidorus*, *Paralongidorus* y *Xiphinema* transmiten varios virus con forma poliédrica conocidos como nepovirus, como *Grape fanleaf virus*, *Tobacco ring spot virus* y otros virus; mientras que los nematodos de los géneros *Trichodorus* y *Paratrachodorus* transmiten al menos dos tobnavirus en forma de bastón, *Tobacco rattle virus* y *Pea early browning virus*. Los vectores de nematodos transmiten virus al alimentarse de raíces de plantas infectadas y luego pasar a raíces de plantas sanas. Los nematodos juveniles y adultos pueden adquirir y transmitir virus; sin embargo, el virus no se transporta a través de las mudas juveniles ni a través de los huevos, y, después de la muda, los juveniles o los adultos resultantes deben alimentarse de una fuente de virus antes de que puedan transmitir nuevamente (Figura 13).

2.5.8. Transmisión por hongos:

Los organismos similares a hongos que infectan la raíz, los plasmodioforomicetos *Polymyxa* y *Spongospora*, y el chitridiomiceto *Ospidium*, transmiten al menos 30 virus vegetales. Aparentemente, algunos de estos virus se transmiten internamente, mientras que otros se transportan externamente en las esporas en reposo y en las zoosporas de los hongos. En la infección de nuevas plantas huésped, los hongos introducen el virus y causan síntomas característicos del virus que transmiten (Figura 13).

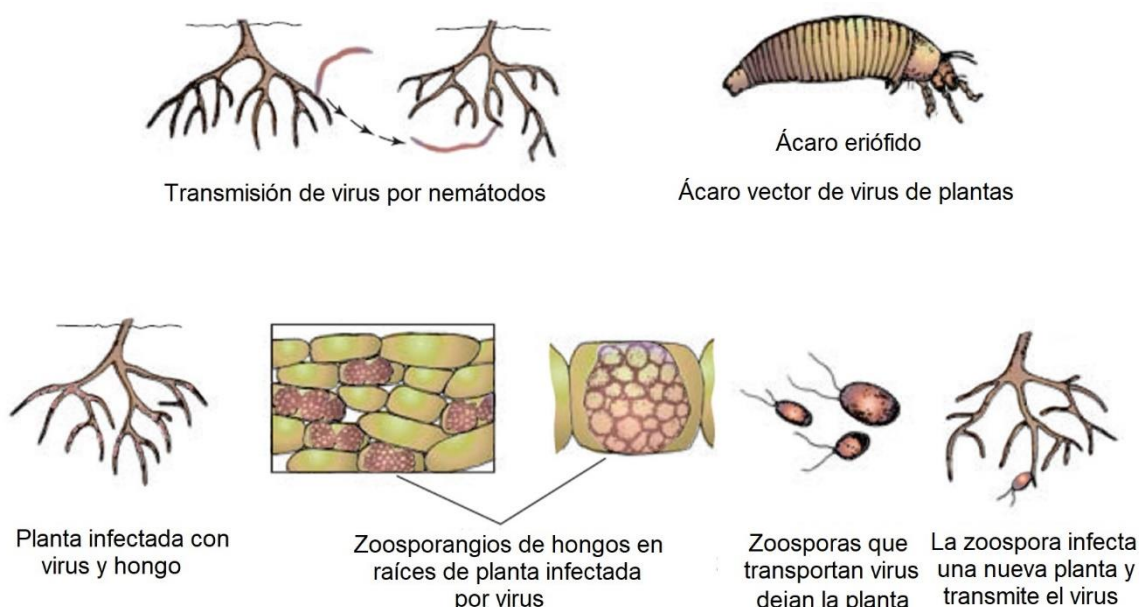


Figura 13. Transmisión de virus de plantas por nematodos, ácaros y hongos. Adaptada de Agrios (2005)

2.6. Género *Nepovirus*

El género *Nepovirus* pertenece a la subfamilia *Comovirinae* (familia *Secoviridae*) y es el único miembro de la familia que codifica una gran proteína de cubierta (CP) de 52-60 kDa. Como los demás miembros de su familia, los viriones se distinguen de acuerdo a su densidad, el cual puede ser superior, medio e inferior; las que se denominan por su letra inicial en inglés: T (*top*), M (*middle*) y B (*bottom*). Los principales viriones (los componentes M y B) contienen ARN. Generalmente, el virión que contiene el ARN1 es el componente B (que sedimenta con valores de $S_{20,W}$ de 150-190S) y el que contiene el ARN2 es el componente M (que sedimenta

con valores de $S_{20,W}$ de 110-135S); salvo los casos en donde el tamaño del ARN1 y ARN2 son similares. La cáscara vacía (componente T), dependiendo del virus, sedimenta a valores de $S_{20,W}$ de 49-63S (Sanfaçon *et al.*, 2012).

Los nepovirus se dividen en tres subgrupos. El subgrupo A tiene un ARN2 de 3700-4000 nts de longitud, presente tanto en los componentes M y B. El subgrupo B tiene un ARN2 de 4400-4700 nts de longitud, presente sólo en el componente M. El subgrupo C tiene un ARN2 de 6400-7300 nts de longitud presente en partículas del componente M que a veces se puede separar apenas del componente B. Los 3 subgrupos también difieren en los sitios de corte reconocido por la proteinasa (Sanfaçon, 2008).

La poliproteína codificada por el ARN2 (P2) de los subgrupos A y B se procesa en tres dominios. En *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), la proteína N-terminal de la poliproteína P2 (2A) parece estar implicada en la replicación del ARN2 (Gaire *et al.*, 1999). Los otros dos dominios de proteína son la proteína de movimiento (MP) y una única cubierta proteica (CP), siendo ambos requeridos para el movimiento célula a célula del virus. De manera similar a los comovirus, el MP tiene un motivo LPL, el cual interactúa con el CP y es un componente estructural de las estructuras tubulares que contienen partículas similares a virus y atraviesan la pared celular (Sanfaçon *et al.*, 2012). En *Tomato ringspot virus* (ToRSV) (Subgrupo C), la región N-terminal de la poliproteína P2 es escindida en un sitio adicional, definiendo 2 dominios (X3 y X4) (Carrier *et al.*, 2001). La proteína X3 contiene algunas similitudes de secuencia con la proteína 2A de GFLV, pero la proteína X4 tiene una función desconocida (Carrier *et al.*, 2001).

El ARN1 de los nepovirus es traducida en una única poliproteína (P1) que es procesada en 6 dominios (Sanfaçon *et al.*, 2012). La región C-terminal de la poliproteína contiene el bloque de replicación, que es similar a la de los comovirus (NTB-VPg-Pro-Pol), el cual en GFLV se realiza en el retículo endoplásmico (Ritzenthaler *et al.*, 2002). En contraste a la región N-terminal de la poliproteína contiene un sitio de corte adicional que define dos dominios de proteínas (X1 y X2) en vez de un único dominio presente corriente arriba del NTB en el genoma de los comovirus (Zhang *et al.*, 2005). El corte de este sitio adicional se demostró para

Arabis mosaic virus (AMV) (subgrupo A) y ToRSV (subgrupo C). La función de la proteína X1 es desconocida, mientras que la proteína X2 contiene un motivo de secuencia común con la proteína cofactor de la proteinasa (Co-Pro) de los comovirus, pero no parece modelar la actividad de la proteinasa. Sin embargo, de forma similar al Co-Pro de los comovirus, la proteína X2 de ToRSV se asocia con membranas derivadas del retículo endoplásmico y se le ha propuesto un rol en la replicación viral (Zhang *et al.*, 2005).

Cuando se comparan el ARN1 y ARN2, los extremos 5' y 3'-UTR son similares en secuencia, pero no son idénticas en los nepovirus del subgrupo A. En los nepovirus del subgrupo B, el extremo 5'-UTR también muestra similitud entre el ARN1 y ARN2, mientras que el 3'-UTR son idénticas en ambos ARN. En los nepovirus del subgrupo C, ambos UTR son idénticos o cercanamente idénticos entre el ARN1 y ARN2, aunque vale mencionar que la región de similitud se extiende hasta una parte de la región codificante de la poliproteína en ToRSV pero no en *Blackcurrant reversion virus* (Sanfaçon *et al.*, 2012).

Los nepovirus son ampliamente distribuidos en regiones templadas. El rango natural de hospederos varía de amplio a estrecho, dependiendo del virus. Los síntomas de mancha anular son característicos, pero igual de frecuentes son el moteado y las manchas cloróticas (Sanfaçon *et al.*, 2012). Veinte especies son adquiridas y transmitidas persistentemente por nematodos de la familia *Longidoridae* (*Xiphinema*, *Longidorus* o *Paralongidorus* spp.), tres son transmitidos por polen, uno es transmitido por ácaros (*Blackcurrant reversion virus*) y otro no tienen vector biológico conocido. La transmisión por semilla y/o polen es muy común (Sanfaçon *et al.*, 2012). En plantas herbáceas, los síntomas inducidos por nepovirus a menudo son transitorios, incluso las hojas nuevas (las que aparecen luego de la infección) parecen asintomáticas (fenómeno denominado “recuperación”). La recuperación de los síntomas está asociada con la inducción del silenciamiento de ARN, una defensa antiviral, y algunas veces está acompañada con la concentración reducida de ARN viral (Jovel *et al.*, 2007).

Los criterios de demarcación de especies para el género *Nepovirus* (y para la familia *Secoviridae*) (Sanfaçon *et al.*, 2012) son:

- Identidad de menos del 75% de identidad de aa de la región de la CP.
- Identidad de menos del 80% de identidad de aa en la región conservada Pro-Pol.
- Diferencias en las reacciones antigénicas.
- Diferente rango de hospederos.
- Distinta especificidad del vector.
- Ausencia de protección cruzada.
- Ausencia de re-arreglo entre el ARN1 y ARN2.

No se necesita que todos los criterios se encuentren simultáneamente (Sanfaçon *et al.*, 2012). En algunos casos, sólo la información de secuencia puede ser un buen indicador de una especie diferente (p.e. cuando el porcentaje de identidad de secuencia tanto en las regiones de Pro-Pol y CP está por debajo de lo requerido). Sin embargo, analizando sólo una región del genoma generalmente no es suficiente, por lo que se deberían considerar ambas regiones (Pro-Pol y CP). En casos donde el porcentaje de identidad de secuencia en una o ambas secuencias está cerca del límite propuesto (p.e. entre 75 y 85% en el Pro-Pol o entre 70 y 80% en la CP), se debería considerar otro criterio y es útil alguna información de las propiedades biológicas del virus (rango de hospederos, especificidad del vector, posibilidad de rearreglo entre ambos ARN). Por ejemplo, *Beet ringspot virus* (BRSV) y *Tomato black ring virus* (TBRV) son cercanos en la secuencia Pro-Pol (89% de identidad) pero son mucho más divergentes en la secuencia de la CP (62% de identidad de secuencia); además ellos difieren en sus reacciones antigénicas y también en la transmisión de nematodos (BRSV es transmitido más eficientemente por *Longidorus elongatus* y TBRV es transmitido más eficientemente por *Longidorus attenuatus*) (Sanfaçon *et al.*, 2012).

2.7. Diagnóstico de virus de plantas

A pesar del desarrollo aparentemente continuo, y cada vez más elaborado, de métodos nuevos para la detección e identificación de virus, muy pocos de estos tienen uso rutinario en los laboratorios. Para entender por qué la tasa de adopción de tecnologías nuevas es tan baja, se requiere una comprensión sólida de lo que hace una buena herramienta de diagnóstico de rutina para comenzar. Esto se

puede hacer mirando a los dos métodos de detección de virus de plantas establecidas con más éxito: ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mediante el examen de las características de estas dos tecnologías, se hace evidente que comparten muchos beneficios, como un formato estándar de la industria y los altos niveles de repetición y reproducción. Estos beneficios se combinan para hacer que los métodos sean accesibles a los laboratorios, que sean fáciles de establecer y robustos en su uso, incluso con los usuarios nuevos y sin experiencia. Por lo tanto, para garantizar el establecimiento de técnicas nuevas es necesario que no sólo proporcionen beneficios que no lo ofrecen ELISA o PCR, sino también que proporcionen una plataforma que sea fácil de establecer y utilizar. En el diagnóstico de virus de plantas, los acontecimientos recientes pueden ser agrupados en tres áreas principales:

- Las técnicas que se pueden realizar en el campo o en lugares con bajos recursos (por ejemplo, la amplificación isotérmica mediada por horquilla (LAMP, por sus siglas en inglés *loop-mediated isothermal amplification*);
- Los métodos múltiplex que son capaces de detectar muchos virus en un solo ensayo (por ejemplo, matrices de perlas Luminex); y
- Los métodos adecuados para el descubrimiento de virus (por ejemplo, la secuenciación de nueva generación, (NGS, por sus siglas en inglés *next generation sequencing*, también conocido como *deep sequencing*) (Boonham *et al.*, 2014)

A continuación, se explica brevemente cada técnica de detección de virus

2.7.1. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

La prueba de ELISA está basada en la producción de un anticuerpo conjugado donde la enzima y el anticuerpo retienen sus propiedades individuales. El anticuerpo se une al antígeno, mientras la enzima detecta y amplifica la reacción. ELISA puede ser usada para discriminar entre materiales sanos de infectados (cualitativa) o para determinar la concentración del virus en los materiales (cuantitativa). Se han descrito varios tipos de ELISA que pueden ser aplicados de acuerdo a la necesidad de la investigación (Salazar,

1996). Debido a su adaptabilidad, sensibilidad y economía en uso de reactivos, ELISA se usa en un amplio rango de situaciones, especialmente para pruebas de un gran número de muestras en un período relativamente corto de tiempo (Naidu y Hughes, 2003).

En la técnica de ELISA en membrana de nitrocelulosa (NCM-ELISA), la cual es un método indirecto, el virus vegetal a ser detectado se fija a una membrana de nitrocelulosa y los anticuerpos específicos se unen a las partículas virales. Luego la presencia del complejo virus-anticuerpo se detecta con anticuerpos preparados contra los anticuerpos específicos del virus conjugado con una enzima (anti-anticuerpos). El paso final es la reacción de la enzima con su sustrato bajo condiciones ideales (Salazar, 1996), lo que genera un cambio de color del sustrato, en caso de ser una reacción positiva.

El desarrollo del ELISA (Clark y Adams, 1977) inició una nueva era en los métodos y tecnologías de evaluación que ha llegado a definir el fitodiagnóstico moderno. Previo a esto, la diagnosis de virus era realizado por especialistas con años de experiencia en el reconocimiento y descripción de síntomas de virus en hospederos, suplementado por métodos complejos y engorrosos tales como bioensayos en plantas indicadoras y el uso de técnicas elaboradas como la microscopía eléctrica de transmisión. Los métodos serológicos han sido utilizados por algún tiempo antes que se haya desarrollado el ELISA, ya sea para propósitos de diagnóstico (i.e., microscopía electrónica inmuno-específico; Derrick, 1972) o para determinar las relaciones taxonómicas de virus (i.e., ensayo de difusión en gel; Bercks, 1967). Sin embargo, estos métodos tenían una variedad de inconvenientes, por ejemplo, el uso de grandes cantidades de antisuero crudo o estar limitado por su formato, y por lo tanto sólo se podían evaluar muy pocos números de muestras (Boonham *et al.*, 2014).

La introducción de ELISA entonces revolucionó el diagnóstico del virus mediante la simplificación de la detección y el acortar el tiempo necesario para llegar a resultados concluyentes (Torrance y Jones, 1981). Otras mejoras llegaron a través del uso de anticuerpos monoclonales, lo que mejoró la sensibilidad y especificidad del ensayo a través de modificaciones del formato

de la prueba, por lo que el ELISA se tornó más versátil y sensible para las pruebas de virus. ELISA fue utilizado rápidamente en laboratorios de investigación y se convirtió en la principal herramienta de las pruebas de virus en áreas tales como el mejoramiento (por ejemplo, la evaluación de resistencia a virus), la cuarentena (por ejemplo, la detección de material importado) y la certificación (por ejemplo, para asegurar el material de siembra está libre de virus) (Boonham *et al.*, 2014).

ELISA se ha establecido como el método más utilizado para la detección de virus en los cultivos, en sustitución de otros métodos más complicados. Por ejemplo, ELISA ha sustituido en gran medida las pruebas de inoculación por injerto de virus que infectan a los árboles frutales como los cítricos (EPPO, 2004a) o frutas de hueso (EPPO, 2004b, 2005). Debido a su velocidad, su facilidad de aplicación, el uso e interpretación de los resultados, ELISA es muy adecuada para pruebas de alto rendimiento (Boonham *et al.*, 2014).

Sin embargo, mientras ELISA tiene muchas ventajas para las pruebas de virus de rutina (Torrance y Jones, 1981), siendo rentable, robusto, fácil de usar y escalable para evaluar un gran número de muestras, también tiene varios obstáculos que limitan su uso como una prueba aplicable universalmente para el diagnóstico de virus de plantas (Boonham *et al.*, 2014). En primer lugar, ELISA y sus diversos formatos requieren antisueros de alta calidad, para permitir la unión específica y sensible a antígenos virales. La producción de tales antisueros requiere experiencia en virología y la capacidad de purificar viriones o cubiertas virales u otras proteínas como antígenos. En segundo lugar, el método ELISA detecta antígenos virales. En general, es eficiente y sensible; e incluso para los virus que no pueden ser purificados, la detección de virus por ELISA puede ser sensible y específico, utilizando antisueros producidos contra las proteínas recombinantes de los virus (Steel *et al.*, 2010). Sin embargo, los antisueros a menudo carecen de la resolución para identificar correctamente las variantes de virus, que están estrechamente relacionados pero que sí tienen un fenotipo distinto, a menudo porque el carácter que determina la variante no se refleja en una variación proteínica de la cubierta. En tercer lugar, ELISA se usa ampliamente como una herramienta de diagnóstico

para evaluar el estado fitosanitario de las plantas, para aplicaciones de cuarentena o certificación virus, y se ha convertido en una parte integral de la indexación de patógenos. Cuando un grupo de diversos patógenos necesita ser evaluado en un cultivo (por ejemplo: la detección en papas de viroides, patógenos virales, bacterianas y fúngicas), ELISA carece de la flexibilidad y la compatibilidad que es inherente a algunos métodos moleculares (Boonham *et al.*, 2014).

2.7.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los métodos basados en hibridación de ácidos nucleicos (NASH, de sus siglas en inglés *nucleic acid spot hybridization*) se han utilizado en gran medida para algunos virus y en particular para los viroides, la técnica que más se ha explotado con éxito se basa en la reacción en cadena de polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés *polimerase chain reaction*). Los métodos de PCR para la detección de virus fueron publicados primero a principios de 1990 (Vunsh *et al.*, 1990) ofrecido con altos niveles de especificidad y sensibilidad. Mientras que la especificidad a menudo se puede lograr, la sensibilidad está frecuentemente por debajo de la expectativa, especialmente en la PCR convencional (utilizando electroforesis en gel para la resolución de los resultados) (Boonham *et al.*, 2014).

Muchos ensayos de PCR para la detección de virus de plantas se han publicado pero muy pocos métodos convencionales de PCR se han utilizado de forma rutinaria en los laboratorios de diagnóstico, debido a una serie de cuestiones prácticas, pero en particular por problemas con la contaminación post-PCR. Efectivamente, la sensibilidad que atrajo a muchos usuarios a la PCR se convirtió en su mayor problema, ya que las pequeñas cantidades de ADN liberado en el ambiente del laboratorio tras la apertura de los tubos después del ciclo térmico podría eventualmente ser detectado por el método de PCR, lo que resulta en problemas con resultados falsos positivos recurrentes. Estos problemas fueron resueltos principalmente por el uso de pruebas de PCR homogéneas y de tubo cerrado comúnmente conocido como PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (q-PCR, *quantitative PCR*) (Boonham *et al.*, 2014).

Inicialmente, el q-PCR se desarrolló para la cuantificación en los estudios de expresión de genes, donde el tiempo en el que se observa la amplificación producida está relacionado con el logaritmo inverso de la cantidad de secuencias blanco (*targets*) que se está amplificando; por lo que este método fue rápidamente adoptado para aplicaciones de diagnóstico (Mumford *et al.*, 2000). Una razón clave es que la señal fluorescente se genera dentro del tubo cerrado de PCR y se puede detectar ya sea durante la amplificación (en "tiempo real") o en el final de la misma ('punto final') sin abrir el tubo; sellando efectivamente en el riesgo de contaminación.

Como el PCR convencional, se han desarrollado y evaluado diferentes formas de PCR en tiempo real para la evaluación de virus; predominantemente, las principales diferencias eran alrededor de las diferentes formas en que la señal podría ser generada dentro de la reacción a medida que este progresaba. Estos eran los métodos basados en sondas [(por ejemplo, TaqManTM, balizas moleculares (*molecular beacons*), sondas escorpión (*scorpion probes*)] o como los no basados en sondas (por ejemplo, SYBR green, cebadores LUX) (Boonham *et al.*, 2014).

Podría decirse que las sondas más utilizadas en el diagnóstico de virus han sido el TaqManTM basada en la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa, y la actividad de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET, *Fluorescent Resonance Energy Transfer*) basada en pares de tintes fluorescentes denominados reporteros (reporters) y extintores (*quencher*s). Los métodos basados en sondas tienen la ventaja añadida de que tres (o más) oligonucleótidos independientes necesitan unirse a la secuencia blanco dentro de la reacción para generar la señal, reduciendo la probabilidad de señales inespecíficas.

En los métodos químicos sin sonda, tales como SYBR green, los perfiles de fusión se utilizan a menudo para discriminar artefactos de cebadores de la amplificación real, lo que añade pasos a la prueba que se está realizando, que no se necesitan en ensayos basados en sondas. De los métodos basados en sondas exploradas, sondas TaqManTM parece ser la más establecida, aunque

esto es probablemente debido a que es uno de los primeros enfoques adoptados y por lo tanto la técnica es más familiar, en lugar de poseer alguna ventaja de rendimiento específicos sobre otros sistemas de sonda.

Las técnicas de PCR en tiempo real para la detección de virus fueron desarrollados inicialmente para aplicaciones que necesitan una mayor sensibilidad (Boonham *et al.*, 2009) o en los que no se podrían utilizar métodos de anticuerpos (Boonham *et al.*, 2004). Sin embargo, más recientemente, los métodos de PCR en tiempo real se han desarrollado para los objetivos donde ELISA no puede ser utilizada, basado puramente en el criterio de rendimiento (es decir, la sensibilidad/especificidad) y por tres principales razones prácticas. En primer lugar, la PCR en tiempo real es más rápida para establecer en comparación con el desarrollo de anticuerpos para virus recién descritos. En segundo lugar, la técnica es de aplicabilidad más genérico que ELISA, especialmente en laboratorios de rutina que buscan llevar a cabo pruebas para las bacterias, hongos y potencialmente de identificación de invertebrados, donde los métodos de ELISA no están tan bien establecidos. Por último, mientras que el costo por prueba de ELISA es menos que el PCR en tiempo real (los costos por reactivos de ensayo son típicamente 50% más alto que para ELISA), el costo de producir un anticuerpo es considerablemente más alto, por tanto, el costo-beneficio a largo plazo debe ser significativa para que la generación de un nuevo anticuerpo sea una propuesta viable. Incluso, debido el éxito de q-PCR, se logró bajar el costo de capital del equipo a menos de una décima parte de hace unos diez años.

Si bien, ELISA y PCR son pruebas muy específicas, no pueden ser un fiel reflejo de la etiología de la enfermedad en particular que puede estar afectando a la planta evaluada, ya que ninguna de estas técnicas en la actualidad diagnostica el potencial de otros virus (conocidos y desconocidos) que puedan estar implicados en la etiología de una enfermedad en particular. Por otra parte, la replicación propensa a error de los virus de ARN que lleva a las cuasi-especies (se dice que una especie de virus no es una población uniforme sino que es una cuasi-especie, cuyo término describe a un tipo reestructura poblacional en el cual las colecciones de los genomas cercanamente

relacionados están sujetos a un continuo proceso de variación genética, competencia y selección; Hull, 2009), que puede complicar las pruebas de detección basadas en PCR, ya que no todas las variantes del virus pueden ser detectadas (Coetzee et al., 2010). Es por ello que aparecieron nuevas técnicas de diagnóstico que permitan detectar diferentes *strains* y/o virus desconocidos, que son los que se comentarán brevemente a continuación.

2.7.3. Métodos de amplificación isotérmica y detección en campo

Los métodos de amplificación isotérmica comparten con la PCR el concepto central de la extensión de una secuencia blanco con cebadores y ADN polimerasa (o en algunos casos, una ARN polimerasa). En términos generales, el reto de amplificación isotérmica, por lo tanto, es permitir la unión del cebador, de tal manera que la amplificación puede ocurrir sin los ciclos repetidos de desnaturalización y reasociación requeridos para la PCR. Hay una serie de enfoques para la generación de sitios de unión del cebador de cadena sencilla sin ciclos térmicos, incluyendo métodos basados en: métodos no térmicos de plantilla de desnaturalización; transcripción de ARN; desplazamiento de la hebra alrededor de una plantilla circular; nicking o degradación parcial de los productos de extensión del cebador para permitir la extensión o rondas adicionales de cebado; y la formación de estructura secundaria que contiene los sitios de una sola hebra de unión a cebador. Mientras que los métodos isotérmicos (por ejemplo, amplificación basada en secuencia de ácido nucleico, NASBA, por las siglas en inglés *Nucleic acid sequence based amplification*) se investigaron inicialmente como alternativas a la PCR o PCR en tiempo real (Leone *et al.*, 1997), se ha renovado el interés en la investigación de estos métodos para aplicaciones en laboratorios con pocos recursos o para realizar pruebas en campo. Dado que estos métodos se basan en la amplificación a una sola temperatura, en lugar de los ciclos térmicos, que pueden realizarse utilizando equipos mucho más simples.

Un enfoque simple para lograr la amplificación isotérmica de ADN es la de separar las hebras de la plantilla de doble hebra por medios no térmicos. La amplificación dependiente de helicasa (HDA) (Vincent *et al.*, 2004) y amplificación de la polimerasa recombinasa (RPA) (Piepenburg *et al.*, 2006)

son dos ejemplos de este enfoque. HDA utiliza una helicasa para separar las hebras de ADN de doble cadena que permiten la unión del cebador y extensión por el ADN polimerasa a una temperatura constante de aproximadamente 65°C. Los tiempos de reacción para HDA están generalmente en el rango de 30-90 min. Este método mantiene la amplificación de productos relativamente cortos de aproximadamente de 70-120 pb. HDA se puede realizar en una sola temperatura, pero la inclusión de una breve incubación a 95 °C antes de la adición de las enzimas HDA se ha demostrado que aumentó la sensibilidad. RPA utiliza una recombinasa que forma un complejo con cebadores para iniciar la amplificación sin desnaturalización térmica. La RPA no requiere un paso inicial de desnaturalización, pero la sensibilidad se incrementa si la reacción se agita después de 5 min de incubación. La reacción se incubaba a una temperatura de reacción baja (entre 37 y 42 °C) que puede ser fácilmente sostenido por un instrumento de baja potencia. Sin embargo, el uso de una baja temperatura de reacción puede dar lugar a la generación de más artefactos de amplificación no específicos que se observan típicamente en métodos de amplificación isotérmica, que utilizan temperaturas de reacción más altas. La principal ventaja de RPA es sus tiempos de reacción cortos, que son típicamente <30 min.

NASBA es un método para la amplificación isotérmica de ARN basado en la transcripción (Compton, 1991). Un cebador modificado se utiliza para incorporar la secuencia del promotor de ARN polimerasa de T7 en un ADN de doble cadena intermedia, funcionalizar el promotor y que resulta en la transcripción de un producto de ARN monocatenario a una temperatura de reacción de 41 °C. NASBA ha sido utilizada para la detección de un número de patógenos de plantas en conjunción con sondas de baliza molecular, en un formato denominado a veces AmpliDet (Klerks *et al.*, 2001). Este formato, en el que la fluorescencia se monitoriza en tiempo real para detectar la hibridación de la sonda con el amplicón monocatenario, es un sistema cerrado de tubo y permite la cuantificación de la secuencia blanco, pero requiere el uso de un instrumento con fluorescencia en tiempo real capacidad de monitoreo. NASBA requiere la desnaturalización de la plantilla para permitir la hibridación del cebador antes de la adición de las enzimas no termoestables, por lo que se

configura a la reacción como un proceso de dos etapas. NASBA se considera que es un método de detección altamente sensible, pero con tiempos de reacción relativamente largos (típicamente 90 min).

Tanto NASBA y HDA se realizan de manera óptima con un perfil térmico de dos etapas y como tal no son realmente isotérmica. RPA, además, requiere que los tubos se puedan agitar manualmente, después de varios minutos de amplificación, para lograr un rendimiento óptimo. Cada una de estas características hace a estas reacciones menos adecuado para su uso en el sitio, aumentando el tiempo y la complejidad de la amplificación.

Otros dos métodos de amplificación isotérmica, que se han aplicado a la detección de patógenos de plantas, son la amplificación círculo rodante (RCA, de sus siglas en inglés *rolling-circle amplification*) y la amplificación isotérmica o quimérica de ácidos nucleicos iniciada por cebadores (ICAN, de sus siglas en inglés *Isothermal and Chimeric primer-initiated*). En su formato más simple, RCA se utiliza para amplificar ácidos nucleicos circulares que utilizan la actividad de desplazamiento de cadena de ADN polimerasa Phi29. RCA seguido de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) se ha utilizado para el diagnóstico de geminivirus que tienen genomas pequeños de ADN circular de cadena sencilla (Haible *et al.*, 2006). Los métodos más complejos basados en RCA hacen uso de sondas de candado circularisable (Banér *et al.*, 1998) para proporcionar plantillas para la amplificación. ICAN utiliza cebadores quiméricos (5'-ADN-ARN-5') con una RNasa H termófila que introduce un nick en la unión entre las porciones de ADN y ARN de los cebadores, y un ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de hebra que continúa la extensión desde el nick (Mukai *et al.*, 2007).

Cada uno de los métodos discutidos hasta ahora tienen diversas ventajas; sin embargo, en el contexto del desarrollo de métodos para la utilización en el lugar, los factores tales como el tiempo de reacción (>1 h en el caso de HDA, NASBA y ICAN) y la complejidad del diseño de ensayo (RPA, RCA para blancos no circulares) son potenciales desventajas. Un enfoque alternativo de amplificación isotérmica es diseñar cebadores tales que los productos de

amplificación contengan sitios únicos de unión de cebadores de cadena sencilla. La amplificación isotérmica mediada por ciclo (LAMP, de las siglas en inglés *loop-mediated isothermal amplification*) es el método más comúnmente utilizado para adoptar este enfoque, utilizando tres pares de cebadores (cebadores internos, externos y de bucle), para generar un producto de amplificación que contiene regiones de bucle de cadena sencilla a la que los cebadores pueden unirse sin plantilla de desnaturalización (Notomi *et al.*, 2000) a una temperatura de reacción de alrededor de 65 °C.

Los cebadores internos introducen una autocomplementariedad dentro del producto de amplificación, causando la formación de bucles, mientras que la extensión de los cebadores externos provoca el desplazamiento de los productos de extensión de los cebadores internos. Los productos de las reacciones de LAMP consisten en repeticiones orientados alternativamente de la secuencia blanco. La adición de cebadores bucle acelera la amplificación mediante su unión en las regiones de bucle que son de la orientación incorrecta de los cebadores internos a unirse. Los cebadores de bucle incrementan la sensibilidad y reducen los tiempos de reacción, y son requeridos para un rendimiento aceptable de algunos ensayos. Sin embargo, para acomodar los cebadores de bucle se requiere una región más larga de la secuencia adecuada, ya que el diseño de dos cebadores de bucle podría no ser posible, y muchos ensayos han sido reportados en la literatura, los cuales logran un rendimiento aceptable sin cebadores de bucle, o con un solo cebador de bucle. Una modificación recientemente descrita de la reacción LAMP incorpora uno o más cebadores “de tallo” (del inglés *stem*), los que se unen a la parte central de doble hebra de cada repetición de la región amplificada, para mejorar aún más el rendimiento del ensayo e incrementar las opciones de diseño de cebadores (Gandelman *et al.*, 2011).

Como LAMP utiliza al menos seis regiones de unión a cebador, es posible diseñar ensayos con una alta especificidad por el posicionamiento de cada cebador en el sitio de no coincidencia (*mismatches*) entre las especies blanco y no blanco. Los ensayos de LAMP se han reportados con sensibilidad comparable a los ensayos de PCR en tiempo real y por lo general superior a la

de PCR convencional (Tomlinson *et al.*, 2007). La técnica LAMP no requiere desnaturalización de la plantilla inicial y recientes desarrollos en el desplazamiento en una hebra del ADN polimerasa muestra una cinética de reacción más rápida, de manera que los tiempos de reacción de LAMP puede reducirse a menos de 30 minutos. LAMP, en común con otros métodos de amplificación isotérmica de ADN, puede ser modificado para la detección de blancos de ARN mediante la adición de transcriptasa inversa para la reacción. En RT-LAMP, la transcripción inversa y la amplificación de ADNc proceden simultáneamente a una única temperatura de alrededor de 65 °C. Significativamente para las pruebas *in-situ*, se ha reportado que LAMP es tolerante de algunas sustancias que son inhibidoras de PCR (Kaneko *et al.*, 2007), lo que potencialmente permite a LAMP ser utilizado en conjunción con métodos de extracción de ácidos nucleicos simplificados.

En el contexto específico de las pruebas *in-situ* de patógenos de plantas, algunas de las características de ensayo son particularmente deseables, incluyendo la velocidad de la amplificación, la simplicidad de flujo de trabajo (es decir, que requiere pocas manipulaciones) y la tolerancia de los inhibidores, todos los cuales se exhiben por la química de LAMP.

2.7.4. Métodos Múltiples (Multiplexing)

La capacidad para realizar pruebas múltiples (es decir, la capacidad para detectar más de un patógeno en un único ensayo) ofrece enormes beneficios de costo, especialmente cuando se requiere probar un gran número de muestras. Esto se ha empleado en técnicas serológicas y se puede utilizar con técnicas moleculares. En términos de *multiplexing*, esta tecnología tiene limitaciones técnicas, con lo que distinguen con precisión las diferentes señales fluorescentes resultantes de reportero múltiple y el tinte extintor (*quencher dye*) utilizados para la detección en tiempo real, lo que limita el número de ensayos que se pueden detectar con precisión en un solo tubo (Mumford *et al.*, 2006).

Si bien los enfoques del *multiplexing* ofrecen beneficios reales en situaciones donde el tamizado de alto rendimiento para múltiples virus u otros agentes patógenos, todavía se limita a la detección de dianas “conocidas”.

Como con ELISA, PCR en tiempo real y otros métodos específicos, utilizando sondas específicas, existe un límite para el grado de variación del patógeno que puede ser detectado y por lo tanto nuevos patógenos o cepas no serían detectados y, por tanto, perdidas.

2.7.5. *Next generation sequencing* en diagnóstico viral

La tecnología del secuenciamiento de última generación (NGS, por sus siglas en inglés *Next generation sequencing*) ha dado lugar a una revolución en el descubrimiento de virus y da posibilidades nuevas e interesantes para el diagnóstico; la aplicación de métodos de secuenciación masiva y el posterior análisis bioinformático de las secuencias virales, da la esperanza de detección de rutina y genérica de virus y otros patógenos. De hecho, varios reportes se publicaron por primera vez en el 2009 cuando se utilizó NGS para identificar diversos virus de plantas, utilizando diferentes plataformas de secuenciación y preparaciones de ácidos nucleicos como material de trabajo (Adams *et al.*, 2009; Al Rwahnih *et al.*, 2009; Kreuze *et al.*, 2009) y muchos otros reportes han continuado. Se han utilizado diferentes plataformas de secuenciación (principalmente Roche 454 e Illumina) los cuales tienen diferencias en costo, facilidad de ensamblaje e identificación de secuencia, pero las distinciones claves residen en las técnicas de purificación del ácido nucleico empleadas.

Mientras que algunas técnicas, tales como la amplificación por círculo rodante (Ng *et al.*, 2011; Hagen *et al.*, 2012) están claramente limitados a ciertos tipos de virus (es decir, virus de ADN circular), otras son más ampliamente aplicables a todo tipo de virus. Varios estudios han tenido éxito, simplemente mediante la secuenciación total de ARNm (Al Rwahnih *et al.*, 2009; Wylie y Jones, 2011; Wylie *et al.*, 2012a, b, 2013). Sin embargo, un inconveniente de esta técnica es que, en particular con los virus con títulos bajos, una cantidad enorme de secuencia se "desperdicia", ya que la mayoría de secuencias será de ARN huésped. A pesar de las mejoras de esta técnica, la secuenciación del ARNm total no puede capturar de manera óptima algunos virus que carecen de las secuencias poliA terminales utilizados para enriquecer ARNm.

Otro método utilizado con frecuencia ha sido el aislamiento de ARN de doble cadena (dcARN) seguido de la síntesis de ADNc al azar (Coetzee *et al.*, 2010; Roossinck *et al.*, 2010; Al Rwahnih *et al.*, 2009). Dado que los ARN de las plantas no forman extensas estructuras de doble cadena, a diferencia de las formas replicativas de los virus de ARN, estos últimos han demostrado su valía en la identificación de virus nuevos y conocidos en los organismos infectados. La corta duración de las secuencias de ARN pequeños de interferencia (ARNpi) plantea desafíos particulares para el montaje de secuencias del genoma completo, especialmente cuando las muestras están infectadas con varias variantes estrechamente relacionadas o, cuando están presentes, moléculas sub-virales defectuosos están presentes.

Independientemente del método de preparación de muestras, cualquier método sólo será utilizado ampliamente si es fácil de usar, relativamente rápido y no demasiado costoso. Mientras que los protocolos rápidos y fáciles se han publicado para la mayoría de las técnicas de purificación de muestras mencionadas, sólo kits comerciales están disponibles para la purificación de ARN total, ARNm y la purificación del ARN pequeños (Boonham *et al.*, 2014).

Los pasos de preparación de ácidos nucleicos antes de la secuenciación, que incluyen etapas en serie de ligaciones de adaptador y el PCR enriquecido pueden ser subcontratados por completo a los proveedores de secuenciación o se llevan a cabo en el laboratorio propio para ahorrar costos. Para aprovechar al máximo el rendimiento de los secuenciadores de NGS, y para reducir el costo por muestra, las muestras son a menudo “etiquetados” mediante la inclusión de un corto fragmento de ADN, a lo que se le denomina «código de barras», durante la preparación de la muestra y se combinan en una línea de secuenciación. Los kits para códigos de barras y de aumento de volumen hasta 96 muestras se encuentran disponibles, Mientras que cada uno de los pasos anteriores se hayan normalizado más o menos, el montaje y la identificación de los *contigs* virales aún no es sencillo y plantea su propio conjunto de desafíos, especialmente en relación con los nuevos virus y variantes de virus.

Se han presentado diferentes soluciones para situaciones específicas (Isakov *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Vodovar *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012) pero ninguno de ellos presenta una solución integral en relación a cada uno de los diferentes temas. El desarrollo de las *pipelines* bioinformáticas automatizadas y universalmente aplicables para el análisis de datos de NGS, específicamente para el descubrimiento y el diagnóstico del virus, sigue siendo un reto que debe cumplirse antes de que estas tecnologías pueden llegar a ser parte de la corriente principal de diagnóstico viral (Zheng *et al.*, 2017).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.5. Hipótesis

H1: Se pueden detectar y caracterizar secuencias virales en papa (*Solanum tuberosum*) con síntomas de cálico mediante la tecnología de secuenciación profunda.

H0: No se pueden detectar y caracterizar secuencias virales en papa (*Solanum tuberosum*) con síntomas de cálico mediante la tecnología de secuenciación profunda.

3.6. Objetivos

3.2.1. Objetivo general

- Caracterizar las secuencias asociadas a nepovirus provenientes de papa detectados en la secuenciación profunda (*deep sequencing*).

3.2.2. Objetivos específicos

- Obtener y analizar las secuencias de nepovirus en papa producidos por secuenciación profunda.
- Ingresar los datos de secuenciación obtenidos en el Genbank.
- Realizar el análisis filogenético.
- Diseñar y evaluar cebadores que permitan la rápida detección del nepovirus caracterizado en 151 muestras de papa provenientes del departamento de Pasco y 67 de Junín.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo se realizó en los laboratorios e invernaderos del área de Virología del Centro Internacional de la Papa (CIP), con sede en La Molina, provincia de Lima – Perú.

4.2. Material biológico

Se utilizó tejido foliar de papa (*Solanum tuberosum* L.) proveniente del centro poblado de Quichas (distrito de Yanacancha, provincia de Daniel A. Carrión, departamento de Pasco, Perú) (Latitud: 10° 39' 16", Longitud: 76° 10' 35") (Figura 14), la cual tenía síntomas de cálico (ver Fig. 3b).

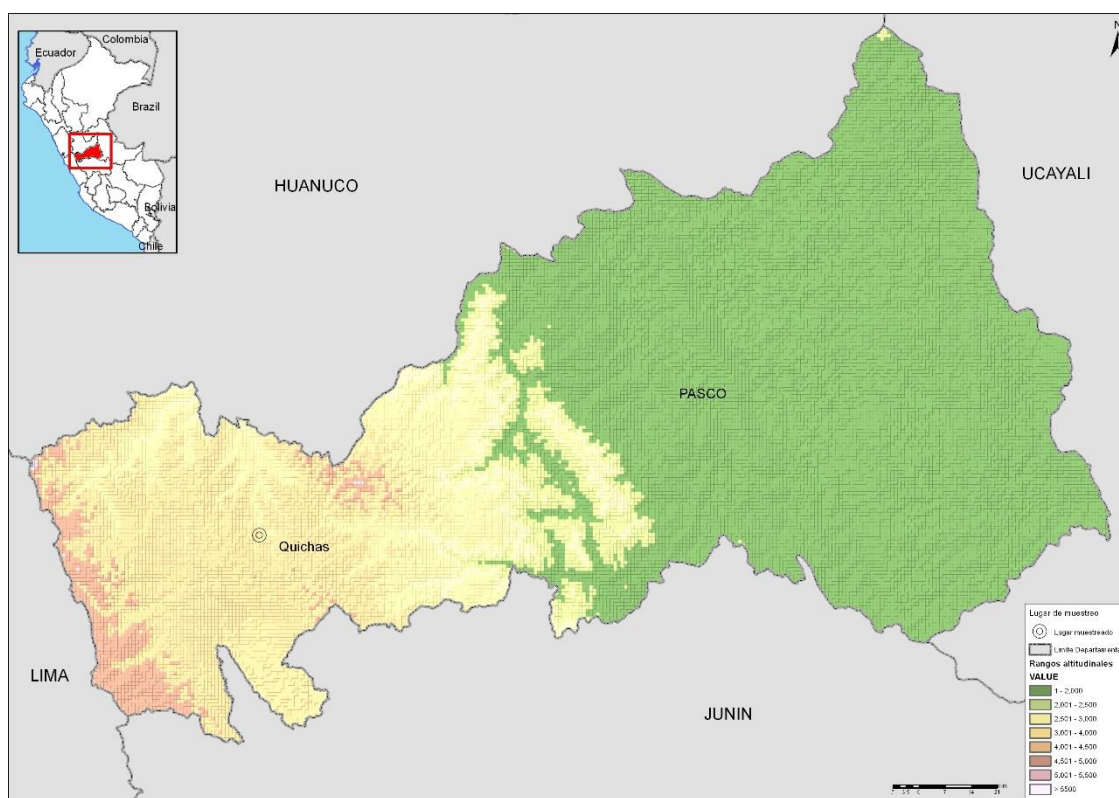


Figura 14. Ubicación del centro poblado de Quichas [departamento de Pasco (Perú)], de dónde provino la muestra infectada con el virus en estudio.

4.3. DAS-ELISA

El procedimiento de DAS-ELISA se llevó a cabo según el método modificado de Clark y Adams (Salazar, 1979). En resumen, el protocolo utilizado fue el siguiente: se sensibilizaron placas con el anticuerpo específico (gama globulina: IgG) de los

siguientes virus: *Potato virus Y* (PVY), *Potato virus X* (PVX), *Potato leafroll virus* (PLRV), *Andean potato latent virus* (APLV), *Andean potato mottle virus* (APMoV), *Potato yellowing virus* (PYV), *Potato virus S* (PVS), *Arracacha virus B* variante oca (AVB-O), los cuales se adhiere a cada pozo de la placa. El exceso se lavó con el tampón carbonatado (carbonato de sodio y bicarbonato de sodio). Luego se incubó 4 horas a 37 °C. Pasado este tiempo se lavaron las placas tres veces por tres minutos con tampón fosfato salino tween 20 (PBS-tween). La placa fue colocada a -20 °C por un día. Al día siguiente se procesó la muestra, la cual se maceró con el tampón de maceración (2% PVP-40, 0.2% albúmina de huevo, PBS tween) y se agregó 100 microlitros (μL) del macerado a cada pozo de la placa para luego incubar la placa a 4 °C toda la noche (18 horas). Posteriormente, se lavó nuevamente la placa tres veces por tres minutos con PBS-Tween, luego se añadió a cada pozo 100 μL del conjugado enzimático diluído en 1/500 en PBS-tween más 2 % de PVP-40 y 0.2 % de albúmina de huevo para ser incubadas por cuatro horas a 37 °C. Por último, se lavó nuevamente la placa como en las veces anteriores con PBS-tween y se añadió 80 μL por pocillo del sustrato fresco de la enzima p-nitrofenil-fosfato (Sigma Chemical Company) en tampón dietanolamina. El desarrollo del color amarillo se midió en un equipo lector de ELISA TECAN SUNRISE utilizando el programa MEGALLAN 7 a 405 nm de onda. Además de la muestra a evaluar, se añadió a la placa una muestra positiva, una muestra sana y muestra blanco (sólo buffer de maceración). Se consideró como positivo a los que tuvieron valores superiores al doble del promedio de la densidad óptica del testigo sano.

4.4. Extracción de ARN

Se molió 200 mg de tejido foliar de la planta con síntomas de cálico en un mortero utilizando nitrógeno líquido. El polvo obtenido se transfirió a un tubo de 2 mL con 1.0 mL de Trizol. Se agitó con un *vórtex* y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos para después centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos en 4° C. Luego se removió el sobrenadante a un nuevo tubo con 0.5 mL de cloroformo y se agitó vigorosamente esta mezcla para luego incubarlas en hielo por 5 minutos y después centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos a 4° C. Se removió el sobrenadante y añadió 0.5 mL de isopropanol. Se mezcló y se dejó a temperatura ambiente por 10 minutos y luego se centrifugó por 14000 rpm por 10 minutos a 4° C. Se eliminó el

sobrenadante y se lavó el *pellet* con etanol 75% para luego secarlo y resuspenderlo en 20 µL de agua libre de nucleasas (NFW, de sus siglas en inglés: *nuclease free water*).

4.5. Preparación de los ARN pequeños de interferencia

Para enviar ARN pequeños de interferencia (ARNpi) para secuenciación profunda (*deep sequencing*), se corrió el ARN total en un gel de agarosa al 4% y se escindió la porción de ARN de 15 a 30 pb. Posteriormente se purificó dicha banda, se liofilizó utilizando un *Speed-vac* y se envió a Fasteris (Suiza) para que realicen el *deep sequencing*.

4.6. Secuenciación profunda (*deep sequencing*)

El secuenciamiento mediante Illumina se basa en el principio de amplificación en puente y el uso de marcaje por fluorescencia de nucleótidos modificados como terminadores reversibles. (Metzker, 2010). En esta tecnología, uno de los adaptadores de los extremos de los fragmentos de ADN o ADNc se liga complementariamente a oligonucleótidos adheridos a una superficie sólida o flow cell. Estos oligonucleótidos harán las veces de cebadores sentido o antisentido, y crean puentes que favorecen la amplificación. Los amplicones permanecerán adheridos y luego de una denaturación formarán otro puente para permitir la amplificación. Estos pasos se repiten hasta generar millones de grupos o clusters de un fragmento determinado (Figura 15a). Una vez formados estos grupos se desnaturalizarán nuevamente para iniciar la polimerización o síntesis de cada fragmento, y se introduce esta vez en la mezcla de síntesis cuatro nucleótidos marcados 3' - O - azidometil o terminadores reversibles (Metzker, 2010, Sedano y Carrascal, 2012).

Los terminadores reversibles (dideoxinucleótidos) detienen la síntesis de ADN una vez la enzima ADN polimerasa integre el nucleótido correspondiente a la cadena nascente. Para determinar la primera base se agregan cuatro nucleótidos marcados fluorescentemente, así como iniciadores y ADN polimerasa después de la excitación láser la fluorescencia emitida por cada grupo es capturado y la primera base es identificada, este ciclo se repite para determinar las secuencias de bases en un fragmento, una base a la vez (Figura 15b, 15c). Esta serie de pasos continúa

por un número determinado de ciclos y permite leer longitudes hasta de 35 nucleótidos (nt). Finalmente, los datos son alineados, almacenados en un computador enviados en formato FASTQ. Por cada muestra se obtuvieron datos de tamaños de 1-32 nt y el índice de calidad en formato FASTQ.

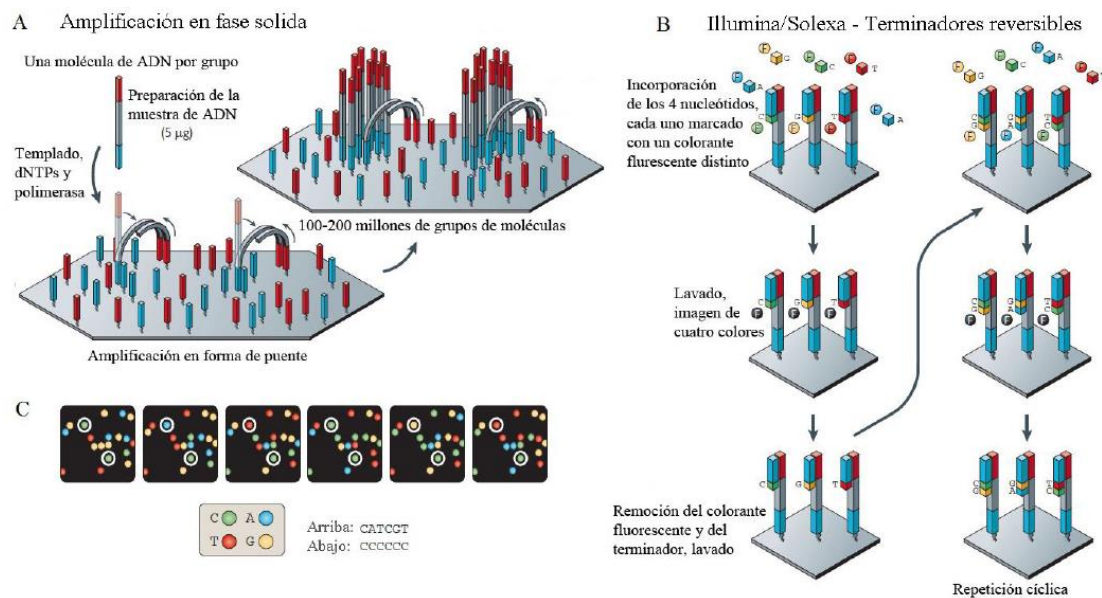


Figura 15. Pasos de secuenciación a gran escala procesados por Illumina. (14a) amplificación en fase sólida; (14b) secuenciación utilizando el método de terminación reversible cíclica (TRC) de cuatro colores utilizando la química del terminador reversible 3'-O-azidometil de Illumina; (14c) Imágenes de cuatro colores que resaltan los datos de secuencia de dos plantillas amplificadas clonalmente. Adaptado de Metzker (2010).

4.7. Análisis de secuencia de ARNpi

Las lecturas (*reads*) producidas del *deep sequencing* se ensamblaron para producir *contigs*, para lo cual se utilizó el programa VELVET (Zerbino y Birney, 2008) bajo el sistema Linux. Este programa es un conjunto de algoritmos utilizados para el ensamblaje de secuencias genómicas, transcriptómicas y *de novo*. VELVET crea un gráfico de Bruijn a partir de las lecturas y elimina los errores del gráfico. Un gráfico de Bruijn es una representación compacta basada en palabras cortas (*k*-mers) que es ideal para conjuntos de datos de alta cobertura, lectura muy corta (25–50 pb). Los *k*-mers son fragmentos de lecturas de secuencia, en donde *k*-mers pequeños darán una mayor conectividad, pero los *k*-mers grandes darán una mejor

especificidad. En este caso en particular, al tratarse de reads pequeños, se utilizó un k-mer de 5.

Los *contigs* producidos se compararon con todas las secuencias de virus de plantas disponibles en el Genbank, para lo cual se hizo uso del BLASTx.

4.8. Unión de *contigs* mediante RT-PCR

Sobre la base de los *contigs* seleccionados, se diseñaron cebadores utilizando el programa Vector NTI, cuyos fragmentos amplificados por RT-PCR sirvieron para unir los diferentes *contigs* que se habían obtenidos (Tabla 1). Los cebadores se diseñaron de tal forma que el T_m esté alrededor de 60 °C. De esta forma, todos los pares de cebadores tuvieron una temperatura de *annealing* de 55 °C. Además, en el diseño de los cebadores, se tomó en cuenta que los cebadores tengan una longitud de 20-28 pb, el porcentaje de GC entre 50-60%, se consideró que los extremos 3' no sean complementarias, ya que esto lleva a la formación de dímeros, y del mismo modo, se evitó a cebadores que formaban secuencias auto-complementarias (habilidad para formar estructuras secundarias).

Para realizar la técnica de PCR, primero se requiere la síntesis del ADN complementario (cuyas siglas en inglés es cDNA) mediante la técnica RT-PCR (del inglés *Reverse transcription polymerase chain reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa) para copiar las secuencias de ARN a ADN. La técnica consiste en hacer una denaturalización de la muestra en un volumen que contiene 1000ng de ARN, 1 µL de cebadores aleatorios (*random primers*) (250 µg/µL), 1 µL de dNTPs 10 mM y NFW hasta completar 12 µL. Este volumen se incubó a 65° C por 10 minutos (para la denaturalización). Posteriormente se añadió 4 µL de buffer RT 5X, 2 µL de DTT 0.1mM, 1 µL de ARNasa SIN ('RNase OUT') y 1 µL de M-MLV (200 U/µL, Invitrogen). El volumen final (20 µL) se llevó a un termociclador Virci (AB – Applied Biosystem) con un programa de 37 °C por 50 minutos, 70 °C por 15 minutos y luego 4 °C. Lo obtenido es lo denominado cDNA.

La amplificación del ADN se realizó por el método PCR. Cada reacción se realizó en un volumen final de 25 µL conteniendo 1 µL del cDNA, buffer de PCR 1X, 2.5mM de MgCl₂, 0.5 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.2 µM de cada

cebador (forward y reverse) y 1U de Taq DNA polimerasa por reacción. Las condiciones en el termociclador Viriti (AB – Applied Biosystem) fueron de 94 °C por 2 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C (dependiendo de los cebadores utilizados) por 30 segundos, 72 °C a 1 minuto por cada kb de producto amplificado 30 segundos y 72 °C por 10 minutos. Los productos amplificados se almacenaron a 4 °C.

Tabla 1. Relación de cebadores utilizados para amplificar el genoma del nuevo nepovirus detectado en la muestra de papa procedente del centro poblado de Quichas.

Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')	Región amplificada	Tamaño amplificado (pb)
NepoWP-5UTR-Rin1*	GGTAAAAAACAATTAAGACTATTATTATTTGC	1 - 261	261
NepoWP1_Fn	TATGGATAGCGCCATAGTTTTACCTTAT	197 - 486	290
NepoWP1_Rn	CTGTATAGGCAGAAATGGTGGTTATACC		
Nepo1-WP_Fa	TCTCCCACTTATATCCAAGTTCTTCC	402 - 1928	1527
Nepo1-WP_Ra	CCGCCACTTTTGCTGCTCTG		
NepoWP-RdRp-F1	CAGCCACCAAGACGGAACCAGCC	2671 - 4648	1978
NepoWP-RdRp-R1	GGTTCTTTAATTGGTACATTGAC		
NepoWP-F2	CAGATTATATGCTCTGAGTGGG	5384 - 6340	957
NepoWP-R2	GGCAAGCCACCGACACCAGCTCC		
NepoWP-RdRp-F3	GCAAAGCGTGTACAGGTATACG	6184 - 7082	899
NepoWP-3UTR-R3	GGACAAACTTATCTCATCGCCAC		
Nepo1-WP_3UTR-F**	CATTCAAGTTCGAAGTTTACAGTTGCC	6797 - 7154	354
Nepo2-WP_5UTR-R*	CTACCAAGGGCTTCAGCTTTGGC	1 - 285	285
Nepo2-WP_3UTR-F**	GACGGCCGGACCTTCTCTCC	4204 - 4527	324
Ban-one primer	ATTGATGGTGCCTACAG		
Ban-two primer	ATCGTAGGCACCTGAAA		

* Utilizado junto con Ban-one primer.

** Utilizado junto con Ban-two primer.

4.9. Clonamiento y secuenciamiento

Los fragmentos de RT-PCR se purificaron utilizando el kit *High Pure PCR Product Purification* (Roche, IN, USA). Los productos de PCR posteriormente fueron clonados en pGEM-T Easy Vector (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos se purificaron de siembra de cultivos de bacterias de *Escherichia coli* DH5α transformados incubados a 37 °C durante toda la noche utilizando EZNA Plasmid Mini Kit I (OMEGA BIO-TEK, GA, USA). Los extremos 3'-5'UTR se amplificaron mediante el uso de adaptadores de ARN que se ligan al ARN viral y realizar posteriormente una amplificación rápida de los extremos del

cDNA producido (Schaefer *et al.*, 1995). Los adaptadores utilizados fueron: Ban-Two (5'-ATC GTrA rGrGrC rArCrC rUrGrA rArA-3') para el caso del extremo 5'-UTR y Mod-Ban (5'-A5'pp CTG TAG GCA CCA TCA AT/ddC/-3') para el caso del 3'-UTR, realizándose posteriormente un RT-PCR con cebadores específicos y proceder con la clonación y purificación de plásmidos como ya se comentó. Dichos plásmidos purificados fueron procesados y enviados a MacroGen-Korea para el secuenciamiento de productos amplificados por el método de Sanger (Sanger, 1977) en un secuenciador automático (Smith, 1986).

El método de secuenciamiento de Sanger utiliza una ADN polimerasa e inhibidores que finalizan la cadena de ADN que está siendo sintetizada en lugares específicos; estos últimos son los dideoxinucleótidos (es decir, nucleótidos que en su carbono 3' no contiene el grupo hidroxilo). La incorporación de una base con estas características en una molécula nascente de ADN impide que una nueva base pueda incorporarse y la síntesis de ADN es interrumpida. Posteriormente, se está utilizando terminadores fluorescentes como variante al método de Sanger; en donde dichas moléculas unidas a cada dideoxinucleótido y permite realizar la reacción en un único tubo, cuya reacción es leída en una computadora.

4.10. Ensamblaje de secuencias

Los *contigs* producidos por VELVET y las secuencias de los productos de PCR se ensamblaron utilizando el programa SEQMAN (paquete DNASTar, Madison, WI). SEQMAN realiza el solapamiento necesario de las secuencias introducidas (*contigs* y amplicones) para generar una secuencia consenso más grande.

Las secuencias obtenidas fueron visualizadas y editadas en el programa Vector NTI (Invitrogen).

4.11. Análisis filogenético

Las regiones obtenidas en secuencia de aminoácidos correspondientes a proteinasa-polimerasa (Pro-Pol) y de la cubierta proteica (CP), se analizaron mediante similitud con las de otros virus de la misma familia viral. Se utilizó el programa MEGA 5 (Tamura, 2011) para el alineamiento múltiple de secuencias, y

para la construcción y análisis de árboles filogenéticos, utilizando el algoritmo de *Neighbor joining* con miembros representativos del género *Nepovirus* (Tabla 2).

Las distancias (sustituciones de aminoácidos por sitio) fueron calculadas utilizando el método de corrección de Poisson. El conjunto de datos fue sometido a 1000 replicaciones de *bootstrap*. lo cual nos permite saber cuán fiables son los nodos que obtenemos. Se considera que un nodo comienza a ser fiable si su valor de *bootstrap* es superior al 50%. Como *outgroup* se utilizó al *Satsuma dwarf virus* (Género *Sadwavirus*. familia *Secoviridae*)

Tabla 2. Especies del género *Nepovirus* utilizados para el estudio de filogenia.

Género	Subgrupo	Especie	Acrónimo	Número de accesoión (NCBI)	
				Región Pro-Pol	Región CP
Nepovirus	A	<i>Tobacco ringspot virus</i>	TRSV	NC_005097.1	NC_005096.1
		<i>Potato black ringspot virus</i>	PBRV	NC_022799.1	—
		<i>Arabidopsis mosaic virus</i>	ArMV	NC_006057.1	NC_006056.1
		<i>Grapevine fanleaf virus</i>	GFLV	NC_003615.1	NC_003623.1
		<i>Grapevine deformation virus</i>	GdefV	NC_017939.1	NC_017938.1
	B	<i>Tomato black ring virus</i>	TBRV	NC_004439.1	NC_004440.1
		<i>Beet ringspot virus</i>	BRSV	NC_003693.1	NC_003694.1
		<i>Grapevine Anatolian ringspot virus</i>	GARSV	NC_0178383.1	NC_018384.1
		<i>Grapevine chrome mosaic virus</i>	GCMV	NC_003622.1	NC_003621.1
		<i>Cycas necrotic stunt virus</i>	CNSV	NC_003791.1	NC_003792.2
	C	<i>Tomato ringspot virus</i>	ToRSV	NC_003840.1	NC_003839.2
		<i>Cherry leaf roll virus</i>	CLRV	NC_015414.1	NC_015415.1
		<i>Blackcurrant reversion virus</i>	BRV	—	NC_003502.1
		<i>Grapevine Bulgarian Latent virus</i>	GBLV	—	NC_015493.1

4.12. Validación

Debido a que se disponía de cebadores que amplifican la RdRp (ARN polimerasa dependiente de ARN) que son NepoWP-RdRp-F1 y R1, NepoWP-F2 y R2, NepoWP-RdRp-F3 y R3, se evaluó su eficiencia e intensidad de amplificación. Posteriormente, se analizaron para diagnóstico 151 muestras del departamento de Pasco y 67 muestras del departamento de Junín.

En resumen, como se muestra en la Figura 16, donde se observa el *pipeline* bioinformático, luego de secuenciar la muestra de papa con síntoma de cálico, se

obtuvieron los *reads*, los cuales se utilizaron para producir *contigs* utilizando el programa VELVET. Se evaluó la similitud de los *contigs* producidos con todas las secuencias de virus depositadas en el Genbank utilizando BLASTx. Las secuencias con una identidad menor al 80% para nepovirus fueron seleccionadas y utilizando el programa SEQMAN se intentó ensamblar algunos *contigs* seleccionados entre ellos. Posteriormente, se determinó la posición de los *contigs* seleccionados de acuerdo a la secuencia viral con las que tuvieron mayor identidad. Después se diseñaron cebadores para completar los *gaps* que se formaron así como para los extremos UTR; dichos cebadores servirán también para, mediante secuenciamiento Sanger, confirmar lo obtenido por el *deep sequencing*. Luego se confirmó el genoma completo mediante los programas MAQ y Novoalign.

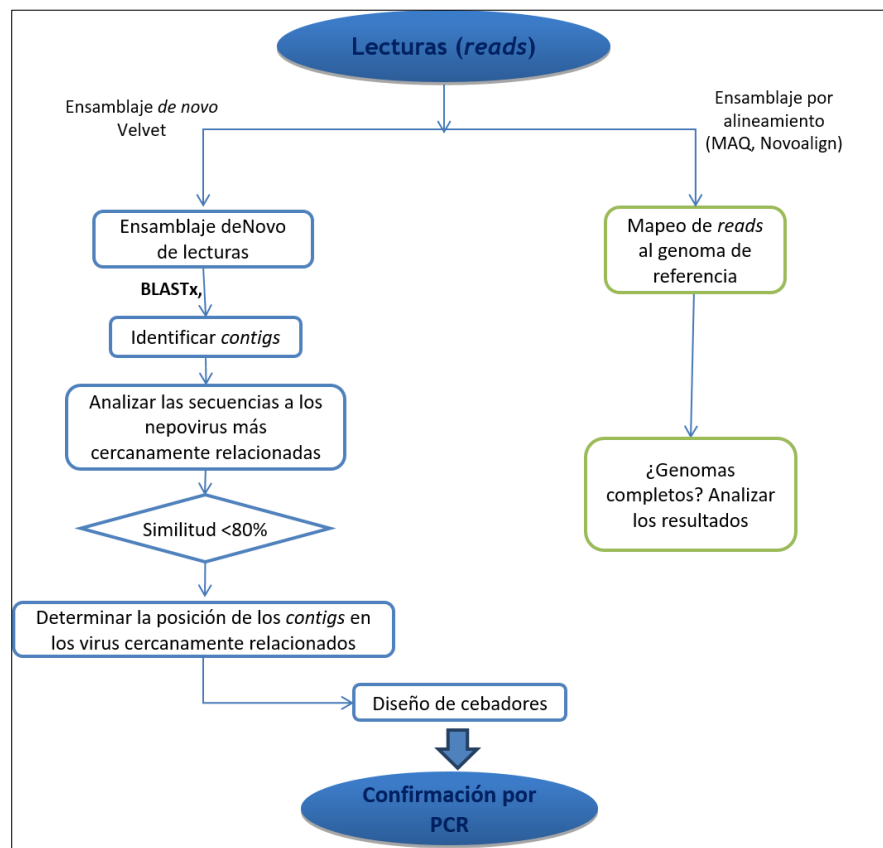


Figura 16. Pipeline bioinformático

5. RESULTADOS

Se tenía a disposición una hoja de papa (*Solanum tuberosum* L.) proveniente del centro poblado de Quichas (departamento de Pasco) el cual mostraba síntomas de cálico. Para saber qué virus se encontraba infectando dicha planta, se procedió a realizar una evaluación de rutina mediante DAS-ELISA contra 8 virus (PVY, PVX, PLRV, APLV, APMoV, PYV, PVS, AVB-O), saliendo positivo sólo para PVX; sin embargo, no se han encontrado reportes que PVX sea causante de este tipo de síntomas. Por ello, se decidió realizar el secuenciamiento de próxima generación de esta muestra para hallar, mediante secuencias, si hay otro virus más infectando esa planta. Los *contigs* con similitud a secuencias virales, se intentaron ensamblar para obtener posteriormente el genoma completo de dicho virus.

El secuenciamiento de la biblioteca de ARNpi produjo un total de 15 871 227 lecturas (*reads*) que tuvieron entre 21-24 nucleótidos (nts). Las búsquedas utilizando BLASTx de esos *contigs* contra secuencias disponibles en la base de datos del GenBank resultaron en seis *contigs* con similitud a nepovirus. Cinco *contigs* correspondieron al ARN1 de nepovirus (los cuales tuvieron tamaños de 2777, 1436, 1342, 1051 y 94 pb) y tres de esos pudieron ser ensamblados en un *super contig* que se ubicó cercano al extremo 3'-UTR, y los otros dos *contigs* estuvieron cercanos al extremo 5'-UTR del ARN1. El *contig* restante (de 4315pb) correspondió a casi toda la secuencia completa del ARN2. Las regiones intermedias faltantes del ARN1 y las regiones terminales de ambos ARN se amplificaron exitosamente mediante los cebadores específicos diseñados y la ligación de adaptadores (en el caso de las regiones terminales).

Las secuencias completas del ARN1 y ARN2 de este nuevo virus (denominado tentativamente Potato virus B, PVB) (número de acceso: NC_043447.1 y NC_043448.1) son 7154 y 4527 nts de longitud, excluyendo la cola poli(A), respectivamente. La organización genómica predicha es similar a la de los otros miembros del género *Nepovirus*, subgrupo B. Ambos ARNs (Fig.16a y 16b) contienen un único marco abierto de lectura (ORF, por sus siglas en inglés, *open reading frame*). Se examinaron las poliproteínas de PVB para evaluar si tenían dominios conservados. Se dedujeron los sitios de corte de los dos ARNs completos de PVB debido a la similitud del dipéptido junto con la secuencia corriente arriba

(*upstream*) utilizando los sitios previamente identificados o inferidos de otros nepovirus del subgrupo B.

La poliproteína del ARN1 (P1), de 225.79 kDa (2264 aa), estuvo precedida de 197 nts en el 5'-UTR y seguido de 216 nts en el 3'-UTR. La P1 representa el 94.22% de la capacidad codificante del ARN1, el más alto de otros nepovirus del subgrupo B, como *Beet ringspot virus* (BRSV, 92.37%), *Grapevine Anatolian ringspot virus* (GARSV, 92.37%), *Grapevine chrome mosaic virus* (GCMV, 93.71%), *Cycas necrotic stunt virus* (CNSV, 93.84%) y *Tomato black ring virus* (TBRV, 92.43 %). Basado en la homología con nepovirus del subgrupo B, se predijo los sitios de corte de la poliproteína P1 por su propia proteinasa viral en seis proteínas maduras:

- X1 (46.6 kDa, función desconocida),
- X2 (21.6 kDa, a menudo referido como un cofactor por analogía a una proteína de comovirus de 32kDa),
- NTB (66.6 kDa, proteína unida a un nucleoside trifosfato o helicase putative),
- VPg (3.1 kDa, proteína unida al genoma viral),
- Proteinasa (Pro) (24.1 kDa) y
- ARN polimerasa dependiente de ARN – RdRp (Pol) (91.6 kDa).

Los dipéptidos que sirvieron como sitio de corte, los cuales se dedujeron por su similitud a las secuencias de nepovirus del subgrupo B previamente identificados, fueron¹: R₄₀₈/A₄₀₉, R₅₉₈/S₅₉₉, K₁₁₉₃/S₁₁₉₄, R₁₂₂₀/S₁₂₂₁, K₁₄₃₀/S₁₄₃₁, los que produjeron las proteínas X1, X2, NTP, VPg, Pro y Pol (Figura 17a). Una vez que se obtuvo el genoma completo del ARN, se utilizó dicha secuencia como referencia para encontrar más *contigs* de ARNpi correspondientes a PVB; de este modo se encontraron dos *contigs* más (uno cercano al 5'-UTR y el otro cercano al 3'-UTR). Posteriormente se realineó los *reads* del ARN1 utilizando el programa Novaalign para confirmar la secuencia obtenida, obteniéndose unas calificaciones de alta calidad en todos los nucleótidos con un promedio de 1551x de 523,735 *reads* alineados (3.29% del total de *reads* de ARNpi) (Figura 18a)

¹ Los números en subíndices indican la posición de los aminoácidos referidos

El ARN2 tuvo un único ORF que codifica para una poliproteína (P2) similar a la de los nepovirus del subgrupo A y B, y es escindido en tres dominios (a diferencia de los del subgrupo C que tienen 4 dominios). La poliproteína P2 tiene un peso molecular de 153.31 kDa (1371 aa), la cual es precedida por 214 nts en el extremo 5'-UTR y seguida por 197 nts en el extremo 3'-UTR. La poliproteína P2 representa el 90.92% de la capacidad codificante del ARN2, más alto que el de otros nepovirus del subgrupo B como BRSV (87.38%), GARSV (87.97%), GCMV (89.43%), CNSV (80.18%) y TBRV (87.02%). Se predijo que el ARN2 de PVB es procesada en una proteína 2A, proteína de movimiento (MP) y la cubierta proteica (CP, 61.4 kDa).

Basado en la comparación de otros nepovirus del subgrupo B, el sitio que contiene el sitio de corte que separa la MP de la CP es L₈₁₂/K₈₁₃. No se pudo identificar el sitio de corte que separa la proteína 2A de la MP. En la Figura 17b, se muestra una estimación del tamaño de la proteína 2A, así como de la posición del sitio de corte que separa a la proteína 2A de la MP. El realineamiento de los ARNpi tomando como secuencia de referencia el ARN2 completo utilizando el programa Novoalign, confirmó la secuencia, obteniéndose una cobertura promedio de 1289x por 274946 *reads* (1.73% del total de *reads*) (Figura 18b).

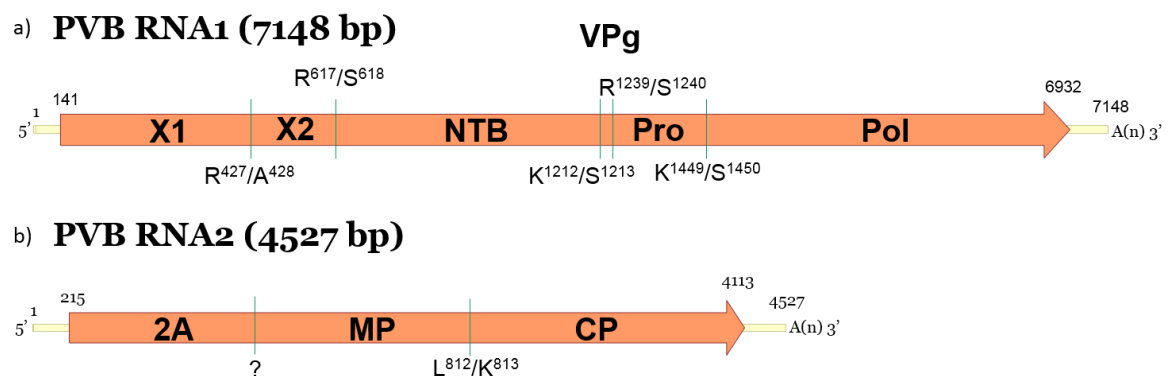


Figura 17. Organización genómica de PVB. Representación esquemática de la organización genómica del virus trabajado en este estudio (Potato virus B - PVB) (16a) ARN1, (16b) ARN2. La poliproteína P1, denominada en el texto para el ARN1, está compuesto por X1, X2, NTB (proteína unida a nucleósido trifosfato o putativa helicasa), VPg (proteína de unión al genoma viral), Pro (proteínasa), Pol (ARN polimerasa dependiente de ARN – RdRp); mientras que la poliproteína P2 (para el ARN2) tiene 2A, MP (proteína de movimiento), CP (cubierta proteica).

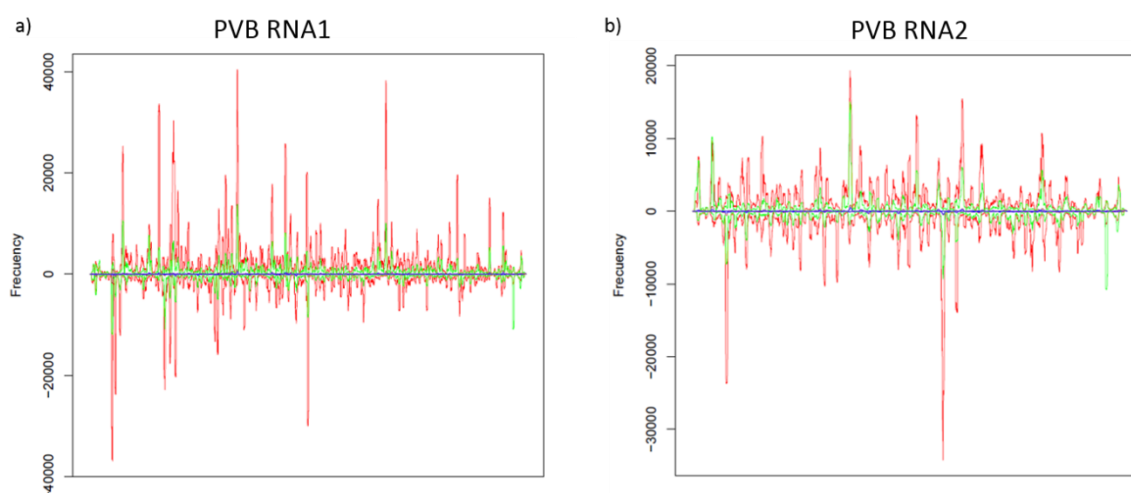


Figura 18. Gráfico de líneas de RNApi de (17a) ARN1 y (17b) ARN2 de PVB. Se observa la cobertura de la secuencia y la profundidad de los *reads* de ARNpi en sentido positivo (por encima de la línea horizontal son los valores positivos) y negativo (por debajo de la línea horizontal, son los valores negativos). El eje X representa la posición del nucleótido y el eje Y representa la cobertura de secuencia (frecuencia) de cada posición de nucleótido.

La identidad entre los extremos 3'-UTR de los 2 ARN de PVB fue 95% (típico de nepovirus), pero la identidad entre los 5'-UTR fue 38%, menor a la de los nepovirus previamente reportados.

La comparación entre PVB y otros miembros del género *Nepovirus*, mostró que PVB tiene un rango de similitud con los nepovirus reportados de 53-71% en la región Pro-Pol y de 25-34% en la región CP (Tabla 3), lo que se visualiza mejor en un árbol filogenético construido sobre de la base de esas 2 regiones de nepovirus tipos de los 3 subgrupos (A, B, C) (Figura 19a y 19b).

Tabla 3. Matriz de identidad (en porcentaje) de secuencias de aminoácidos de las regiones Pro-Pol y CP de Potato virus B con los virus más cercanamente relacionados. *Tomato black ring virus* (TBRV), *Grapevine chrome mosaic virus* (GCMV), *Beet ringspot virus* (BRSV), *Cycas necrotic stunt virus* (CNSV), *Grapevine Anatolian ringspot virus* (GARSV)

PVB	Pro-Pol (%)	CP (%)
TBRV	71	32
GCMV	68	30
BRSV	70	31
CNSV	53	25
GARSV	69	34

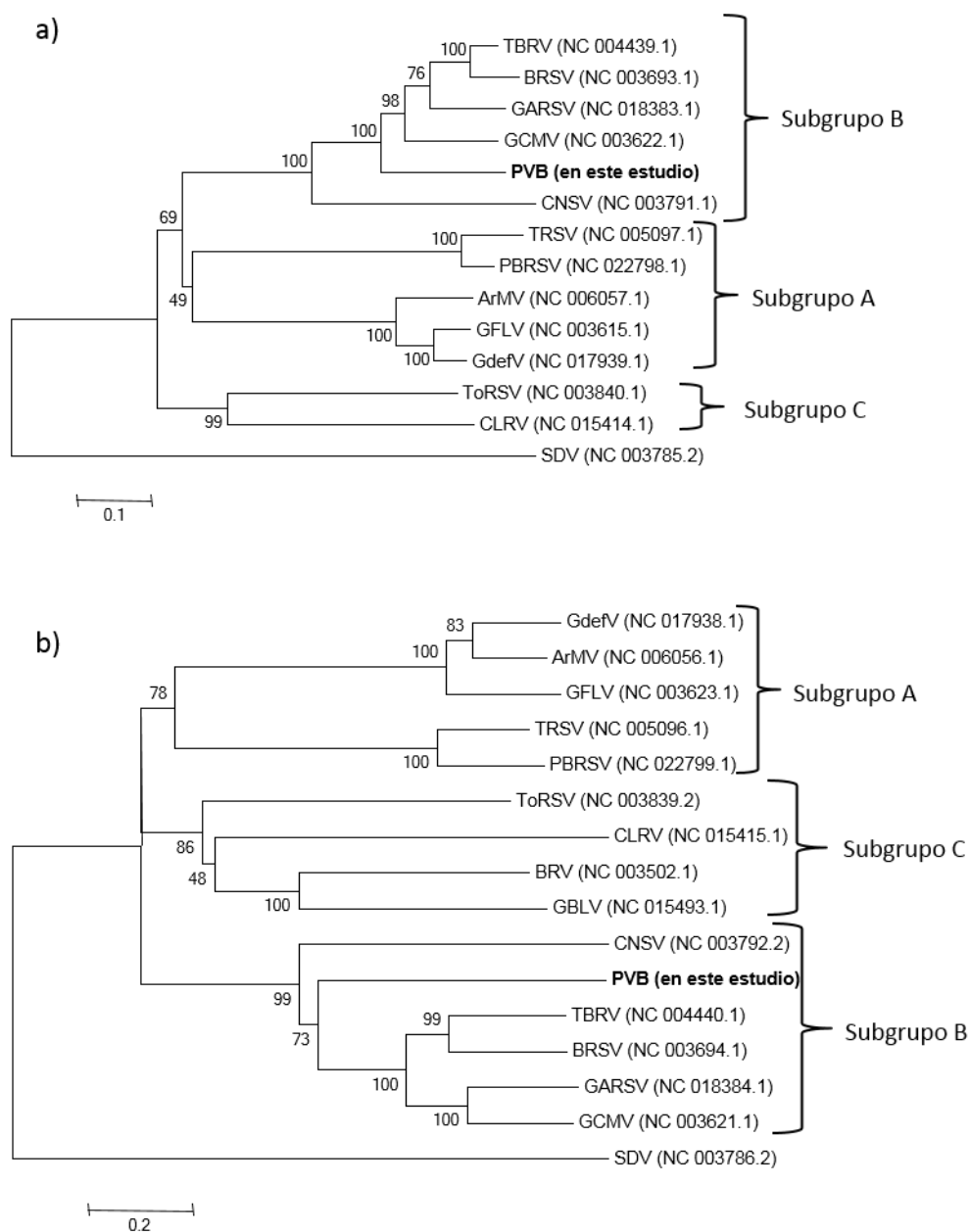


Figura 19. Árboles filogenéticos de miembros del género *Nepovirus* basado en las secuencias de aminoácidos de la (18a) región Pro-Pol y (18b) región CP. El árbol se construyó utilizando el programa MEGA5, mediante el método de Neighbor-Joining con un análisis *bootstrap* de 1000 repeticiones. La barra indica sustituciones de nucleótidos por sitio (modelo de dos parámetros de Kimura). Se utilizó las secuencias de *Satsuma dwarf virus* (SDV) como *outgroup*. Las secuencias de virus utilizadas en la construcción de estos árboles fueron: TBRV (*Tomato black ring virus*), BRSV (*Beet ringspot virus*), GARSV (*Grapevine Anatolian ringspot virus*), GCMV (*Grapevine chrome mosaic virus*), CNSV (*Cycas necrotic stunt virus*), TRSV (*Tobacco ringspot virus*), PBRSV (*Potato black ringspot virus*), ArMV (*Arabis mosaic virus*), GFLV (*Grapevine fanleaf virus*), GdefV (*Grapevine deformation virus*), ToRSV (*Tomato ringspot virus*), CLRV (*Cherry leaf roll virus*), BRV (*Blackcurrant reversion virus*), GBLV (*Grapevine Bulgarian Latent virus*).

Se utilizaron los cebadores diseñados que amplifican la región de la polimerasa para confirmar si la secuencia que se obtenga de esa región, es la misma del genoma obtenido por *deep sequencing*. De la misma forma, se utilizó el par de cebadores NepoWP-F2 y R2 (Tabla 1) para detectar este virus en hojas de plantas de papa con síntomas de cálico colectadas en Pasco y Junín. De las 151 muestras de Pasco, 28 fueron positivas (18.5%): sin embargo, de las 67 muestras evaluadas de Huancayo, sólo dos fueron positivas (2.9%). Algunas muestras positivas se secuenciaron y se analizaron para evaluar la variabilidad de PVB, y en el árbol filogenético construido con esas secuencias, se pudo diferenciar dos grupos, pero sin relación geográfica (Figura 20). La distribución de las muestras analizadas se puede visualizar en la Figura 21, y las coordenadas de cada localidad evaluada, así como el número de muestras evaluadas por localidad, es posible visualizarlo en la Tabla 4.

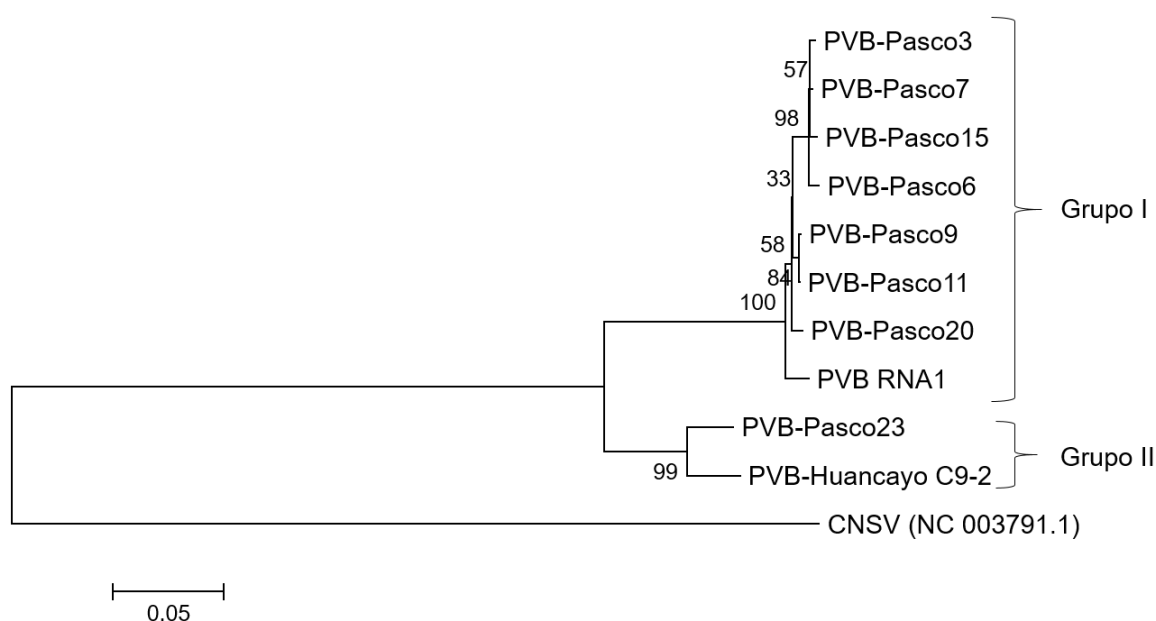


Figura 20. Árbol filogenético construido con la región de la polimerasa amplificada de los aislados de PVB. El árbol se construyó utilizando el programa MEGA5, mediante el método de Neighbor-Joining con un análisis *bootstrap* de 1000 repeticiones. La barra indica sustituciones de nucleótidos por sitio (modelo de dos parámetros de Kimura). Se utilizó a CNSV como *outgroup*.

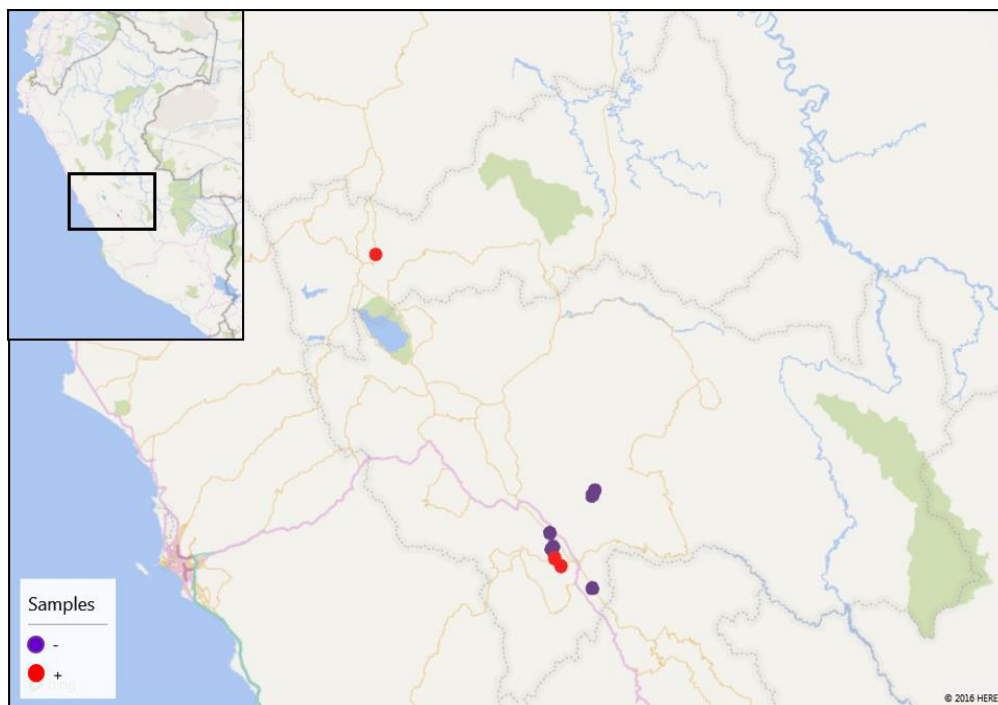


Figura 21. Distribución de muestras positivas y negativas evaluadas para PVB

Tabla 4. Coordenadas de las localidades de las muestras evaluadas y el número de muestras positivas para Potato virus B por sitio.

Departamento	Localidad	Altitud	Latitud	Longitud	Número de muestras	PVB
Pasco	Quichas	4007	-10.65444444	-76.17638889	151	28
Junín	Mucchu	3824	-11.76527778	-75.14555556	8	0
Junín	Mucchu	3824	-11.76055556	-75.14	3	0
Junín	Pomamanta	3579	-11.73972222	-75.13	5	0
Junín	San Antonio de Sicaya	3354	-11.98833333	-75.32666667	8	0
Junín	San Antonio de Sicaya	3378	-11.99972222	-75.33527778	5	0
Junín	Pucará	3327	-12.16888889	-75.14833333	7	0
Junín	Chupaca	3264	-12.0725	-75.29138889	10	1
Junín	Huayao	3334	-12.03861111	-75.32055556	10	1
Junín	Mitos	3279	-11.92833333	-75.34138889	11	0

6. DISCUSIÓN

Actualmente, las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducidas de los genes y genomas virales se han convertido en el criterio individual más importante utilizado en la taxonomía viral (King *et al.*, 2012). Esto porque dichos datos de secuencia por sí solos son suficientes para agrupar los aislados virales y, a menudo, para determinar si deben considerarse la misma especie viral (Valkonen, 2007). De la misma forma, dicha información hallada de agentes virales recientemente detectados, serviría para identificar dicho agente y clasificarlo en su respectiva taxonomía.

En esta tesis, se evaluó la eficiencia del *deep sequencing* para poder identificar nuevos virus que previamente no han sido reportados. En el presente trabajo, esta tecnología fue capaz de identificar un nepovirus cuya secuencia no se encontraba en el NCBI y no tenía un porcentaje de identidad significativo con otro, de forma tal que se pueda afirmar que sea de esa especie viral, cumpliendo de este modo la hipótesis de la presente tesis. Dicho nuevo nepovirus se denominó tentativamente Potato virus B (PVB), y se utilizó los datos obtenidos por *deep sequencing* para caracterizar su genoma. El *deep sequencing* ha ayudado a detectar nuevas especies y *strains* de virus de plantas por el análisis de ARN pequeños de interferencia de origen viral extraídos de tejidos infectados (Kreuze *et al.*, 2009; Kreuze *et al.*, 2013; Giampetruzzi *et al.*, 2012; Fuentes *et al.*, 2012; De Souza *et al.*, 2013). Se utilizó esta tecnología para identificar al posible agente infeccioso que causa síntomas de cálico en papa de los Andes centrales de Perú. Este virus no pudo ser aislado debido a que la muestra evaluada estaba coinfectada con *Potato virus X* (PVX), como se reportó previamente (Kutnjak *et al.*, 2014); ya que el PVX se transmite por contacto e infecta una gran cantidad plantas indicadoras por inoculación mecánica.

Se pudo identificar los dos primeros dominios de la poliproteína P1 (X1 y X2) y son considerados una característica de varios nepovirus (Wetzel *et al.*, 2008). Los estudios realizados en *Tomato ringspot virus* (ToRSV), un nepovirus del subgrupo C, reveló que el X2 y NTB son proteínas integrales de membrana direccionadas a la membrana del retículo endoplásmico, el sitio de replicación del ARN (Wang y

Sanfaçon, 2000; Han y Sanfaçon, 2003; Zhang y Sanfaçon, 2006; Zhang *et al.*, 2005). El sitio de corte que separa los dominios de la proteína 2A y MP de la poliproteína P2 ha sido previamente identificado en los nepovirus del subgrupo A y C, pero hasta la fecha no se ha podido encontrar en algún virus del subgrupo B; del mismo modo, tampoco se pudo detectar este sitio de corte en PVB. En *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), nepovirus del subgrupo A, se demostró que la región N terminal de la poliproteína P2 está implicada en la replicación del ARN2 (Gaire *et al.*, 1999). Otras proteínas maduras procesadas del P2 son la MP y la CP, las cuales son necesarias para el movimiento célula a célula del virus. De forma similar a los comovirus, la MP de PVB tiene un motivo LPL que interactúa con la CP y es un componente de la estructura tubular que contiene partículas similares a virus que atraviesa la pared celular (Sanfaçon *et al.*, 2012).

De acuerdo a Sanfaçon *et al.* (2012), el criterio para definir a las especies dentro de la familia *Secoviridae* son: tener una identidad menor al 80% en aminoácido (aa) en la región proteinasa – ARN polimerasa dependiente de ARN (Pro-Pol) del ARN1 o tener una identidad menor de 75% aa en la región CP del ARN2. Estos puntos se cumplieron (ver tabla 3), por lo que dio el indicio que el PVB podría tratarse de una nueva especie viral. Para confirmar dicha afirmación, se evaluó además la organización genómica (una vez obtenido los genomas completos del ARN1 y ARN2) y el análisis filogenético; este último con las dos regiones recomendadas por Sanfaçon *et al.* (2012), lo que ratificó que PVB corresponde a una nueva especie viral que pertenece al género *Nepovirus*, que además se ubica dentro del subgrupo B de este género viral.

Muchos nepovirus son transmitidos por nemátodos habitantes del suelo que pertenecen a tres géneros cercanamente relacionados: *Xiphinema*, *Longidorus*, o *Paralongidorus* de la orden *Dorylaimida*, familia *Londigoridae* (Sanfaçon, 2009). El género *Longidorus* es, hasta ahora, el único nemátodo reportado que transmite nepovirus del subgrupo B, mientras que *Xiphinema* y *Paralongidorus* han sido reportados que transmiten nepovirus del subgrupo A y C. El género *Longidorus* es considerado una especie cuarentenaria por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) (SENASA, 2010). Sin embargo, Jones *et al.* (1983) reportaron experimentos preliminares con *Longidorus* spp., que habían sido recolectados en

Perú; además Ciancio *et al.* (1989, 2011) también informaron la presencia del nemátodo *Longidorus*.

Por ello, sería de prioridad confirmar el vector de PVB, así como la presencia de *Longidorus* spp. en Perú. Dicho nemátodo induce agallas en la punta de la raíz, la cual contiene células agrandadas con forma ameboide que contienen cantidades aumentadas de ADN, pero no células multinucleadas (Griffiths y Robertson, 1983), como es el caso de *Xiphinema* (Wyss *et al.*, 1988). Vale agregar que el período de tiempo que un nemátodo puede retener partículas virales afectará, en ciertas circunstancias, su eficiencia como vector (Brown *et al.*, 1995). Los virus son menos persistentes en *Longidorus* spp. generalmente permanece transmisible solo durante aproximadamente 8 semanas, a diferencia de *Xiphinema*, en donde el virus se encuentra transmisible de 8 a 12 meses (Taylor, 1972; Brown *et al.*, 1995).

El árbol filogenético construido utilizando las muestras sintomáticas de Pasco y Junín mostraron que hay variabilidad en esta especie viral, similar a GFLV como lo determinaron Oliver *et al.* (2010), donde el RdRp también se utilizó como una fuente para analizar la variabilidad viral. No se pudo aislar este virus, debido a que las plantas disponibles (incluido la secuenciada) se encontró *Potato virus X* (PVX); sin embargo, no se ha reportado que PVX produzca síntomas de cálico. Por otro lado, mientras PVB se asoció siempre con síntomas de cálico (todas las muestras positivas tuvieron síntomas de cálico), no todas las muestras evaluadas con esos síntomas fueron positivas para este virus. Por lo tanto, posiblemente, de acuerdo a la variedad de la papa, PVB contribuiría a los síntomas de cálico observados; por lo que debería ser prioridad estudios futuros en este aspecto, incluyendo el posible impacto en la producción.

Es conocido que las regiones más conservadas en los virus de plantas son la RdRp y la CP. Los cebadores diseñados en la región de la RdRp (ARN polimerasa dependiente de ARN) fueron utilizados para realizar el diagnóstico de PVB en muestras de papa. Debido a que la CP en los nepovirus se encuentra en el ARN2, no se diseñó ningún cebador contra esta proteína ya que no hubo la necesidad de completar *gaps* como sí fue en el caso del ARN1. Los cebadores de la RdRp funcionaron eficientemente al momento de amplificar un *gap* entre *contigs*

obtenidos por *deep sequencing*, por lo que se utilizó para evaluar a región faltante para secuenciar entre gaps del RNA1. Estos cebadores sirvieron de forma eficiente para diagnosticar PVB en 151 muestras de papa de Pasco y 67 de Junín; por lo que sería recomendable hacer las evaluaciones respectivas en más zonas paperas para conocer la distribución exacta de este nuevo agente viral. La incidencia de un virus es importante conocer ya que permite conocer que tanto se está controlando la enfermedad en el tiempo y de este modo evitar la aparición de una posible pandemia.

La biología y la etiología de los nuevos virus se estudian mejor en el área geográfica nativa, sobre todo para reducir el riesgo de dispersión accidental de los virus (Valkonen, 2007). El movimiento de germoplasma de papas infectadas con virus constituye un alto riesgo de diseminación de virus hasta la fecha desconocidos a otras partes del mundo, sobre todo desde nuestro país, tomando en cuenta que, por ser centro evolutivo de especies de papa (Hawkes, 1990; Ochoa, 1999), la mayoría de virus de dicho cultivo se originan en los Andes. La detección sistemática y la caracterización de virus que infectan a la papa en sus hábitats naturales son importantes para desarrollar anticuerpos, cebadores y sondas, los que son necesarios para la detección de virus durante el movimiento internacional de germoplasma. El Centro Internacional de la Papa (CIP) en Perú ha trabajado para la caracterización de muchos virus de la papa desde su creación (Salazar, 1996, 2006).

Por ello, es importante acelerar la detección y eliminación de patógenos del germoplasma de las plantas cuando se trate de introducir germoplasma para, entre otras, el mejoramiento de la producción agrícola; para lo cual se debe encontrar un equilibrio entre la exclusión de plagas mediante el uso de medidas cuarentenarias (Martin y Postman, 1999). Esto porque la destrucción del material vegetal el cual se le encontró infectado con un patógeno o los muchos años de pruebas a menudo requeridos antes de que el material pueda liberarse de la cuarentena, ha frustrado a los agricultores, horticultores y mejoradores ansiosos por incorporar nuevos recursos genéticos en sus programas (Plucknett y Smith, 1989). El cultivo *in vitro* y las técnicas de diagnóstico molecular aceleran la detección y eliminación de patógenos del germoplasma de las plantas. La protección de los clones que se

evalúan contra virus en los programas de certificación ayuda a salvaguardar el valioso material vegetal y evitar la reintroducción de patógenos en el stock limpio (Martin y Postman, 1999).

Las principales formas de control de virus en los campos de cultivo, son la obtención de plantas libres de virus y la generación de plantas resistentes a virus. Para la primera, es importante para evaluar las plántulas producidas luego del método de termoterapia y cultivo de meristemos, mediante un método de diagnóstico de los virus que afectan el cultivo de interés, y así tener la seguridad que dichas plantas producidas (las cuáles serán las generadoras de semillas) no van a poseer los virus evaluados. La presente tesis propone justamente un método de diagnóstico para el PVB. En la generación de plantas resistentes a virus, es un requisito indispensable poseer la biodiversidad necesaria para poder encontrar genes de resistencia (vertical u horizontal), que mediante técnicas de mejoramiento genético (ya sea convencionales o biotecnológicas), permita producir cultivos con un cierto nivel de resistencia contra los virus de interés. Se conocen algunas variedades de papa con resistencia a virus, como es el caso de las variedades Roja Ayacuchana (resistente a PVY y PVX), Tocasina (resistente a PVX), Única (resistente a PVY, PVX y PLRV), María Bonita (inmune a PVY), Desértica y Costanera (inmune a PVY y PVX), Primavera (inmune a PVY y PVX, y resistente a PLRV) (Egúsquiza, 2000), los cultivares Tomasa Condemayta (tiene resistencia al vector de PLRV) y cv Mariva (tiene resistencia a la infección de PLRV) (Fribourg, 2007)

Sobre la generación de plantas resistentes a virus, es necesario conocer que las plantas poseen un sistema inmune dinámico que puede activar diferentes mecanismos de defensa en respuesta a la invasión de patógenos, incluyendo la infección por virus (Jones y Dangl, 2006). Se han definido dos sistemas de defensa innatos en las plantas: el reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs o MAMP) por los receptores de las plantas y la inmunidad activada por efectores (ETI) (Muthamilarasan y Prasad, 2013). Los PAMP (MAMP) son moléculas altamente conservadoras asociadas con las diferentes clases de patógenos y reconocidas por el sistema inmune innato de la planta. El reconocimiento de PAMP induce una respuesta de protección básica en las

primeras etapas de interacción entre la planta y el patógeno y se conoce como inmunidad activada por PAMP (PTI). Sin embargo, muchos patógenos bien adaptados pueden evadir el reconocimiento por parte de los receptores de la planta e infectarla. En esta etapa, la planta puede reconocer el patógeno infeccioso con la ayuda de proteínas R (proteínas de resistencia), que interactúan, directa o indirectamente, con los efectores del patógeno, que a diferencia de los PAMP son específicos de la especie, o incluso específicos de la cepa. Dicha interacción induce ETI, una fuerte respuesta específica de defensa de la planta que en muchos casos está asociada con la muerte celular programada local (respuesta hipersensible, HR) para bloquear la reproducción y propagación de patógenos (Deslandes y Rivas, 2012). La mayoría de las proteínas R contienen un sitio de unión a nucleótidos y repeticiones ricas en leucina y se denominan proteínas NBS-LRR. Estas proteínas desencadenan cascadas de señalización, que conducen a la FC a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Este tipo de resistencia del huésped se ha caracterizado lo suficientemente bien y comúnmente se considera que es un tipo de resistencia gen por gen. Esta respuesta suele ser muy específica tanto para el genotipo / cultivar de la planta como para un determinado patógeno (Flor, 1971). Sobre esto, es conocido el gen dominante Ry que se encontró en la papa silvestre *Solanum stoloniferum* y en *S. tuberosum* subsp. andigena, las cuales generaron resistencia extrema a PVY. Asimismo, el gen Nx, encontrado en ciertas selecciones de *S. tuberosum* subsp. andigena que otorga resistencia extrema a PVX. Por otro lado, Barker y Dale (2006) describieron siete tipos principales de resistencia a los virus de la papa: (1) resistencia a la infección, también conocida como resistencia horizontal o de campo; (2) resistencia a la acumulación de virus; (3) resistencia al movimiento del virus a través de la planta; (4) resistencia de la planta madura; (5) tolerancia; (6) resistencia a vectores de virus; y (7) HR.

Es necesario la existencia y la implementación adecuada de laboratorios de Virología en diferentes partes del mundo para la caracterización de los virus de la papa menos estudiados, así como la correcta identificación y diagnóstico de los ampliamente estudiados. Esto es cada vez más factible gracias a las últimas tecnologías disponibles para la detección y caracterización de virus (Valkonen, 2007).

De acuerdo a los resultados obtenidos, la utilidad del *deep sequencing* es bastante grande, ya que se puede ampliar su uso al diagnóstico viral, ya que es capaz de detectar agentes virales sin un conocimiento previo de dicho patógeno; siendo capaz de producir un 0% de falsos negativos, ya que puede detectar la más mínima secuencia viral, la cual se puede luego comparar en un BLAST. Sin embargo, hay que tener en consideración que es necesario el acceso a recursos y experiencia, aparte que la tecnología de NGS requiere una gran inversión, haciendo que hace que solo sea adecuada para laboratorios bien financiados y centralizados. No obstante, las fuerzas del mercado comercial pueden cambiar esa situación, bajando los costos de capital y reactivos en el tiempo.

7. CONCLUSIONES

1. De acuerdo al análisis de la organización genómica, la comparación de secuencias y el análisis filogenético, Potato virus B (PVB) es una nueva especie viral perteneciente al género *Nepovirus*.
2. El PVB presenta en la organización genómica del ARN1 las proteínas: X1, X2 (ambas de función desconocida), NTB (helicasa), VPg (proteína unida al genoma viral), proteinasa y RdRp (ARN polimerasa dependiente de ARN). En la organización genoma del ARN2 se puede reconocer las proteínas 2A, proteína de movimiento y la cubierta proteica.
3. El método de secuenciación profunda es un método eficiente de diagnóstico viral, ya que es capaz de detectar virus conocidos como los que no disponen de secuencia conocida que permita su detección, como era el caso del PVB.
4. El análisis filogenético ubica al PVB dentro del subgrupo B del género *Nepovirus*.
5. El cebador de la replicasa es adecuado para el tamizado del PVB y útil para diagnóstico.
6. La incidencia de este virus es de un 13.76% (30 muestras positivas) en las 218 muestras evaluadas; siendo este un porcentaje relativamente alto.

IX. RECOMENDACIONES

1. Es prioridad confirmar que *Longidorus* sp. es el vector de PVB, así como su presencia de en Perú.
2. Utilizar la RT-PCR como un método de diagnóstico rápido como ensayo de detección en las regulaciones cuarentenarias de PVB.
3. Fortalecer la limpieza de virus en plántulas de papa *in vitro* con el fin de obtener plantas sanas para ensayos biológicos y movimiento de germoplasma
4. Realizar pruebas de patogenicidad para confirmar la relación de síntomas de cálico con PVB.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams, I.; Glover, R.; Monger, W.; Mumford, R.; Jackeviciene, E.; Navalinskiene, M.; Samuitiene, M.; Boonham, N. (2009). Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology*, 10: 537–545.
2. Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. Academic press.
3. Al Rwahnih, M.; Daubert, S.; Golino, D.; Rowhani, A. (2009). Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. *Virology*, 387: 395–401.
4. Barker, H.; Dale, M. F. B. (2006). Resistance to viruses in potato. En *Natural resistance mechanisms of plants to viruses* (pp. 341-366). Springer, Dorcrecht.
5. Bercks, R. (1967). Methodische Untersuchungen über den serologischen Nachweis pflanzen pathogener Viren mit dem Bentonit-Flockungstest, dem Latex-Test und dem Bariumsulfat-test. *Phytopath. Z.* 58, 1–17.
6. Boonham, N.; Pérez, L.G.; Mendez, M.S.; Peralta, E.L.; Blockley, A.; Walsh, K.; Barker, I.; Murford, R. A. (2004). Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Potato spindle tuber viroid. *Journal of Virological Methods*, 116: 139–146.
7. Boonham, N., Laurenson, L., Weekes, R., Mumford, R. (2009). Direct detection of plant viruses in potato tubers using real-time PCR. In: Burns, R. (Ed.), *Methods in Molecular Biology* No. 508: *Plant Pathology: Techniques and Protocols*. Humana Press, New York, USA, pp. 249–258.
8. Boonham, N.; Kreuze, J.; Winter, S.; van der Vlugt, R.; Bergervoet, J.; Tomlinson, J.; Mumford, R. (2014). Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing, *Virus Research* 186: 20–31.

9. Brown, D. J. F.; Robertson, W. M.; Trudgill, D. L. (1995). Transmission of viruses by plant nematodes. *Annual review of phytopathology*, 33(1), 223-249.
10. Carrier, K.; Xiang, Y.; Sanfaçon, H. (2001). Genomic organization of RNA2 of Tomato ringspot virus: processing at a third cleavage site in the N-terminal region of the polyprotein in vitro. *Journal of General Virology*, 82: 1785–1790.
11. Ciancio A, Mankau R. (1989). Note on *Pasteuria* sp. parasitic in Longidorid nematodes. *Nematropica* 19(1):105–110.
12. Ciancio A, Roca F, Carbonell Torres E (2011). New records of Longidorid nematodes in central Peru. Book of abstracts of XLIII meeting of Organization of Nematologists of Tropical America (ONTA), p 139.
13. CIP (International Potato Center) (2016). Potato Facts and Figures (<http://cipotato.org/potato/facts>, accessed 10 August 2016).
14. Clark MF; Adams AN. (1977). Characteristics of the microplate method of enzymelinked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 334: 475–83.
15. Coetzee, B.; Freeborough, M.; Maree, H.; Celton, J.; Jasper, D.; Rees, G.; Burger, J. (2010). Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard. *Virology* 400: 157-163.
16. Compton, J. (1991). Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 350, 91–92.
17. De Souza, J.; Fuentes, S.; Savenkov, E.; Cuellar, W.; Kreuze, J. F. (2013). The complete nucleotide sequence of sweet potato C6 virus: a carlavirus lacking a cysteine-rich protein. *Archives of Virology* 158: 1393-1396.
18. Deslandez, L.; Rivas, S. (2012) Catch me if you can: Bacterial effectors and plant targets, *Trends Plant Sci.* 17 (11): 644–655.

- 19.Derrick, K.S. (1972). Immuno-specific grids for electron microscopy of plant viruses. *Phytopathology* 62: 753-754.
- 20.Egúsqüiza, B. R. (2000). La papa: producción, transformación y comercialización. International Potato Center.
- 21.EPPO. (2004a). Diagnostic protocol for regulated pests. Citrus tristeza virus. OEPP/EPPO Bull. 34, 239–246.
- 22.EPPO. (2004b). Diagnostic protocol for regulated pests. Plum pox potyvirus. OEPP/EPPO Bull. 34, 155–157.
- 23.EPPO. (2005). Diagnostic protocol for regulated pests. Tomato ringspot nepovirus. OEPP/EPPO Bull. 35, 271–273.
24. FAOSTAT. (2013). <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- 25.Flor, H. H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 9: 275–296
- 26.Fribourg, C.E. (1977). Andean potato calico strain of Tobacco ringspot virus. *Phytopathology* 67(2):174–178.
- 27.Fribourg, C. C. (2007). Virus, Viroides y Mollicutes de las Plantas Cultivadas en el Perú. 219 pp. Servicios y Publicidad WEB sac. San Borja, Lima, Perú.
- 28.Fuentes, S.; Heider, B.; Tasso, R.C.; Romero, E.; ZumFelde, T.; Kreuze, J.F. (2012). Complete genome sequence of a potyvirus infecting yam beans (*Pachyrhizus* spp.) in Peru. *Archives of Virology* 157(4):773–776.
- 29.Gaire, F.; Schmitt, C.; Stussi-Garaud, C.; Pinck, L.; Ritzenthaler, C. (1999). Protein 2A of Grapevine Fanleaf Nepovirus Is Implicated in RNA2 Replication and Colocalizes to the Replication Site. *Virology* 264: 25-36.

30. Giampetruzzi, A.; Roumi, V.; Roberto, R.; Malossini, U.; Yoshikawa, N.; La Notte, P.; Terlizzi, F.; Credi, R.; Saldarelli, P. (2012). A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris. *Virus Research* 163, 262–268.
31. Gandelman, O.; Jackson, R.; Kiddle, G.; Tisi, L. (2011). Loop-mediated amplification accelerated by stem primers. *International Journal of Molecular Sciences* 12, 9108–9124.
32. Griffiths, B.S.; Robertson, W.M. (1983). Nuclear changes induced by the nematode *Longidorus elongatus* in root-tips of ryegrass *Lolium perenne*. *Histochem. J.* 15:927-34
33. Hagen, C.; Frizzi, A.; Gabriels, S.; Huang, M.; Salati, R.; Gabor, B.; Huang, S. (2012). Accurate and sensitive diagnosis of geminiviruses through enrichment, high-throughput sequencing and automated sequence identification. *Archives of Virology*, 157: 907–915.
34. Haible, D.; Kober, S.; Jeske, H. (2006). Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *Journal of virological methods* 135, 9–16.
35. Han, S.; Sanfaçon, H. (2003). Tomato ringspot virus proteins containing the nucleoside triphosphate binding domain are transmembrane proteins that associate with the endoplasmic reticulum and cofractionate with replication complexes. *Journal of Virology* 77: 523 – 534.
36. Hawkes J.G. (1990) *The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources*. Belhaven Press, London, U.K.
37. Hull, R. (2009). *Comparative Plant Virology*. Elsevier Academic press.

38. Isakov, O.; Modai, S.; Shomron, N. (2011). Pathogen detection using short-RNA deep sequencing subtraction and assembly. *Bioinformatics*, 27: 2027–2030.
39. Jones, R.A.C.; Fribourg, C.E.; Koenig, R. (1983). A previously undescribed Nepovirus isolated from potato in Peru. *Phytopathology* 73:195–198.
40. Jones, J.D.; Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature*, 444 (7177): 323–329.
41. Jones, R.A.C.; Charkowski, A.; Fribourg, C. E.; Stevenson, W. R.; Slack, S. A. (2009). Potato Virus and Viruslike Diseases. In: *Virus Diseases of Plants: Grape, Potato, and Wheat Image Collection and Teaching Resource CD-Rom*. APS Press, St. Paul, MN 55121.
42. Jovel, J.; Walker, M.; Sanfaçon, H. (2007). Recovery of *Nicotiana benthamiana* plants from a necrotic response induced by a nepovirus is associated with RNA silencing but not with reduced virus titer. *Journal of Virology*, 81: 12285–12297.
43. Kaneko, H., Kawana, T., Fukushima, E., Suzutani, T. (2007). Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *Journal of biochemical and Biophysical Methods* 10, 499–501.
44. Kerlan, C. (2009). Potato viruses. In: Mahy, B., Regenmortel, M. (eds.) *Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology*. Elsevier Ltd., pp: 458 – 471.
45. King, A.M.Q.; Adams, M.J.; Carstens, E.B.; Lefkowitz, E.J. (2012) *Virus taxonomy, IX Report of ICTV*. Elsevier Academic Press, London.
46. Klerks, M.M.; Leone, G.O.; Verbeek, M.; van den Heuvel, J.F.; Schoen, C.D. (2001). Development of a multiplex AmpliDet RNA for the simultaneous detection of Potato leafroll virus and Potato virus Y in potato tubers. *Journal of virological methods* 93, 115–125.

47. Kreuze, J.F.; Perez, A.; Untiveros, M.; Quispe, D.; Fuentes, S.; Barker, I.; Simon, R. (2009). Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: a generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology* 388, 1–7.
48. Kreuze, J.; Koenig, R.; De Souza, J.; Vetter, H.J.; Müller, G.; Flores, B.; Ziebell, H.; Cuellar, W. (2013). The complete genome sequences of a Peruvian and a Colombian isolate of Andean potato latent virus and partial sequences of further isolates suggest the existence of two distinct potato-infecting tymovirus species. *Virus Research* 173: 431-435.
49. Kutnjak, D.; Silvestre, R.; Cuellar, W.; Perez, W.; Müller, G.; Ravnikar, M.; Kreuze, J. (2014). Complete genome sequences of new divergent potato virus X isolates and discrimination between strains in a mixed infection using small RNAs sequencing approach. *Virus Research* 191: 45-50.
50. Leone, G.; van Schijndel, H.B.; van Genien, B.; Schoen, C.D. (1997). Direct detection of potato leafroll virus in potato tubers by immunocapture and the isothermal nucleic acid amplification method NASBA. *Journal of virological methods* 66, 19–27.
51. Li, S.C.; Chan, W.C.; Lai, C.H.; Tsai, K.W.; Hsu, C.N.; Jou, Y.S.; Chen, H.C.; Lin, W.C. (2011). UMARS: un-mappable reads solution. *BMC Bioinform.* 12 Suppl 1: S9.
52. Makarova, S. S.; Makarov, V. V.; Taliansky, M. E.; Kalinina, N. O. (2017). Virus resistance in potato: Current state and prospects. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 7(8), 845-857
53. Martin, R. R.; Postman, J. D. (1999). Phytosanitary aspects of plant germplasm conservation. In *Plant Conservation Biotechnology* (pp. 89-108). CRC Press.
54. Metzker, M.L. (2010) Sequencing technologies – the next generation. *Nature reviews genetics*, 11(1), 31-46.

55. Mukai, H.; Uemori, T.; Takeda, O.; Kobayashi, E.; Yamamoto, J.; Nishiwaki, K.; Enoki, T.; Sagawa, H.; Asada, K. (2007). Highly efficient isothermal DNA amplification system using three elements of 5'-DNA-RNA-3' chimeric primers, RNaseH and strand-displacing DNA polymerase. *The Journal of Biochemistry*, 142: 273–281.
56. Mumford, R.A., Walsh, K., Barker, I., Boonham, N. (2000). Detection of Potato mop top virus and Tobacco rattle virus using multiplex real-time fluorescent RT-PCR assay. *Phytopathology* 90, 448–453.
57. Mumford, R.A.; Boonham, N.; Tomlinson, J.; Barker, I. (2006). Advances in molecular phytodiagnostics – new solutions for old problems. *European Journal of Plant Pathology*, 116: 1–19.
58. Muthamilarasan, M.; Prasad, M. (2013) Plant innate immunity: An updated insight into defense mechanism, *J. Biosci.* 38(2) 433–449.
59. Naidu, RA; y Hughes J d'A. (2003). Methods for the detection of plant virus diseases. Pp 233–260. En: *Plant Virology in Sub-Saharan Africa* (J.d'A. Hughes, B.O. Odu, eds.). Proceedings of a conference organized by IITA, 4–8 June 2001, Ibadan, Nigeria.
60. Ng, T.F.F., Duffy, S., Polston, J.E., Bixby, E., Vallad, G.E., Breitbart, M. (2011). Exploring the diversity of plant DNA viruses and their satellites using vector-enabled metagenomics on whiteflies. *Plos One* 6, e19050.
61. Notomi, T.; Okayama, H.; Masubuchi, H.; Yonekawa, T.; Watanabe, K.; Amino, N.; Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28(12): E63.
62. Ochoa, C.M. (1999, *Las Papas de Sudamérica: Perú*. International Potato Center, Lima, Peru.
63. Piepenburg, O.; Williams, C.H.; Stemple, D.L.; Armes, N.A. (2006). DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol.* 4, e204.

- 64.Plucknett, D.L.; Smith, N.J.H. (1989). Quarantine and the exchange of crop genetic resources, *BioScience*, 39(1), 16–23.
- 65.Richards, R. S., Adams, I. P., Kreuze, J. F., De Souza, J., Cuellar, W., Dulleman, A. M.; Boonham, N. (2014). The complete genome sequences of two isolates of potato black ringspot virus and their relationship to other isolates and nepoviruses. *Archives of virology*, 159(4), 811-815.
- 66.Ritzenthaler, C.; Laporte, C.; Gaire, G.; Dunoyer, P.; Schmitt, C.; Duval, S.; Piéquet, A.; Loudes, A. M.; Rohfritsch, O.; Stussi-Garaud, C.; Pfeiffer, P. (2002). Grapevine fanleaf virus replication occurs on endoplasmic reticulum-derived membranes. *Journal of Virology*, 76: 8808–8819.
- 67.Roossinck, M.J.; Saha, P.; Wiley, G.B.; Quan, J.; White, J.D.; Lai, H.; Chavarría, F.; Shen, G.; Roe, B.A. (2010). Ecogenomics: using massively parallel pyrosequencing to understand virus ecology. *Molecular Ecology*, 19: 81–88.
- 68.Salazar, L.F. (1979). Aplicación de la técnica serológica con conjugados enzimáticos (ELISA) para diagnosticar virus de papa. *Fitopatología* 14:1-9
- 69.Salazar, L.F. (1996). Potato Viruses and Their Control. Centro Internacional de la Papa CIP (Perú). Publicado por el Centro Internacional de la Papa. 226 p.
- 70.Salazar, L.F. (1997). Identificación y Control de Enfermedades Virales y Fitoplasmas de la Papa. Simposium Internacional de la Papa. Metepec, Estado de México. 3 p.
- 71.Salazar, L.F. (2006). Emerging and Re-emerging Potato Diseases in the Andes. *Potato Research* 49: 43-47.
- 72.Salazar, L.F.; Harrison, B.D. (1977). Two previously undescribed potato viruses from South America. *Nature* 264: 337-338.

73. Salazar, L. F.; Harrison, B. D. (1978), The relationship of potato black ringspot virus to tobacco ringspot and allied viruses. *Annals of Applied Biology*, 90: 387–394.
74. Sanfaçon, H. (2008). Nepovirus. In: Mahy, B., Regenmortel, M. (eds.) *Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology*. Elsevier Ltd., pp: 235 – 243.
75. Sanfaçon, H.; Iwanami, T.; Karasev, A.V.; van der Vlugt, R.; Wellink, J.; Wetzels, T.; Yoshikawa, N. (2012). Family Secoviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds) *Virus taxonomy, IX Report of ICTV*. Elsevier Academic Press, London, pp. 881–899.
76. Sanger, F; Nicklen, S; Coulson, AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 74(12): 5463–5467.
77. Schaefer, B.C. (1995). Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Analytical Biochemistry* 227: 255–273.
78. Sedano, J.C.S; Carrascal, C.E.L (2012). RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Fitosanidad*, 16(2), 101-113
79. SENASA. (2010). <http://spij.minjus.gob.pe/graficos/peru/2010/junio/20/RD-32-2010-AG-SENASA-DSV.pdf>.
80. Smith, LM; Sanders, JZ; Kaiser, RJ; Hughes, P; Dodd, C; Connell, CR; Heiner, C.; Kent, S.B.H.; Hood, L.E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321 (6071): 674-679.
81. Steel, E., Barker, I., Danks, C., Coates, D., Boonham, N. (2010). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transient expression as a tool for antigen production for

Cucurbit yellow stunting disorder virus. Journal of virological methods 163, 222–228.

82.Stevenson, W.; Loria, R.; Franc, G.; Weingartner, D. (Eds.) (2001). Compendium of Potato Diseases. The American Phytopathological Society, second edition.

83.Struik, P.C.; Wiersema, S.G. (1999). Seed Potato Technology. Wageningen Pers, The Netherlands. 383 pp.

84.Taylor, C. E. (1972). Nematode transmission of plant viruses. PANS Pest Articles & News Summaries, 18(3), 269-282.

85.Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.

86.Tomlinson, J.A.; Barker, I.; Boonham, N. (2007). Faster, simpler, more-specific methods for improved molecular detection of *Phytophthora ramorum* in the field. Applied and Environmental Microbiology 73, 4040–4047.

87.Torrance, L.; Jones, R.A.C. (1981). Recent developments in serological methods suited for use in routine testing for plant viruses. Plant Pathology 30: 1–24.

88.Valkonen, J. P. (2007). Viruses: economical losses and biotechnological potential. En: Potato biology and biotechnology (pp. 619-641). Elsevier Science BV.

89.Vincent, M.; Xu, Y.; Kong, H. (2004). Helicase-dependent isothermal DNA amplification. EMBO Rep. 5, 795–800.

90.Vodovar, N.; Goic, B.; Blanc, H.; Saleh, M.C. (2011). In silico reconstruction of viral genomes from small RNAs improves virus-derived small interfering RNA profiling. Journal of Virology, 85: 11016–11021.

91. Vunsh, R.; Rosner, A.; Stein, A. (1990). The use of the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of Bean yellow mosaic virus in gladiolus. *Annals of Applied Biology* 117, 561–569.
92. Wang, A.; Sanfaçon, H. (2000). Proteolytic processing at a novel cleavage site in the N-terminal region of the tomato ringspot nepovirus RNA-1-encoded polyprotein in vitro. *Journal of General Virology* 81: 2771–2781.
93. Wetzel, T.; Chisholm, J.; Bassler, A.; Sanfaçon, H. (2008). Characterization of proteinase cleavage sites in the N-terminal region of the RNA1-encoded polyprotein from Arabis mosaic virus (subgroup A nepovirus). *Virology* 375:159–169.
94. Wu, Q.; Wang, Y.; Cao, M.; Pantaleo, V.; Burgyn, J.; Li, W.-X.; Ding, S.-W. (2012). Homology-independent discovery of replicating pathogenic circular RNAs by deep sequencing and a new computational algorithm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 3938–3943.
95. Wylie, S.J.; Jones, M.G.K. (2011). The complete genome sequence of a Passion fruit woodiness virus isolate from Australia determined using deep sequencing, and its relationship to other potyviruses. *Archives of Virology*, 156: 479–482.
96. Wylie, S.J.; Luo, H.; Li, H.; Jones, M.G.K. (2012a). Multiple polyadenylated RNA viruses detected in pooled cultivated and wild plant samples. *Archives of Virology*, 157: 271–284.
- 97.
98. Wylie, S.J.; Tan, A.J.Y.; Li, H.; Dixon, K.W.; Jones, M.G.K. (2012b). Caladenia virus A, an unusual new member of the family Potyviridae from terrestrial orchids in Western Australia. *Archives of Virology*, 157: 2447–2452.
99. Wylie, S.J.; Li, H.; Dixon, K.W.; Richards, H.; Jones, M.G.K. (2013). Exotic and indigenous viruses infect wild populations and captive collections of temperate terrestrial orchids (*Diuris* species) in Australia. *Virus Research*, 171: 22–32.

100. Wyss, V.; Robertson, W.M.; Trudgill, D.L. (1988). Esophageal bulb function of *Xiphinema* index and associated root cell responses, assessed by video enhanced light microscopy. *Rev. Nematol.* 11: 253-261.
101. Zerbino, D.; Birney, E. (2008). Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research* 18: 821 – 829.
102. Zhang, S.C.; Zhang, G.; Yang, L.; Chisholm, J.; Sanfacon, H. (2005). Evidence that insertion of Tomato ringspot nepovirus NTB-VPg protein in endoplasmic reticulum membranes is directed by two domains: a C-terminal transmembrane helix and an N-terminal amphipathic helix. *Journal of Virology* 79: 11752-11765.
103. Zhang, G.; Sanfacon, H. (2006). Characterization of membrane association domains within the Tomato ringspot nepovirus X2 protein, an endoplasmic reticulum-targeted polytopic membrane protein. *Journal of virology* 80: 10847–10857.
104. Zheng, Y.; Gao, S.; Padmanabhan, C.; Li, R.; Galvez, M.; Gutierrez, D.; Fuentes, S.; Ling, K.; Kreuze, J.; Fei, Z. (2017). VirusDetect: An automated pipeline for efficient virus discovery using deep sequencing of small RNAs. *Virology*, 500: 130-138.

XI. ANEXOS

11.1. ANEXO 1. Reactivos para electroforesis

Tampón TAE (50X)

A 600 mL de agua mili-Q, añadir:

Tris-base (Sigma)242 g

Ácido acético glacial (MERCK).. 57.1 mL

EDTA 0.5M pH 8 100.0 mL

Enrasar a 1 litro.

SALB 10X

Para un volumen final de 100 mL, agregar:

Azul de bromofenol (Sigma).... 150 mg

Xilen cianol (BIO-RAD)150 mg

Naranja-G (MERCK)200 mg

TAE 1X 5mL

Sucrosa 60 g

11.2. ANEXO 2. Protocolo de Ligación

1. Centrifugar el tubo eppendorff con el vector a usar (pGEM-T Easy o pUC19) para colectar todo el contenido al fondo del tubo.

2. Agregar los reactivos de la siguiente manera:

Realizar un vortex al tampón 2X de ligación rápida, del kit de la pGEM-T, antes cada uso.

Tampón 2X de ligación rápida.... 5 µL

Vector pGEM-T easy (25ng) 1 µL

Producto PCR X* µL

Ligasa T4 DNA 1 µL

Agregar agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 10 µL

3. Mezclar la reacción por pipeteo. Incubar la reacción toda la noche a 4° C.

* Para calcular la cantidad apropiada del producto de PCR (inserto) a incluir en la reacción de ligación, se usa la siguiente reacción.

$$\frac{\eta g \text{ de vector} \times \text{tamaño del inserto}(kb)}{\text{tamaño del vector}(kb)} \times \text{ratio molar inserto:vector} = \eta g \text{ de inserto}$$

Ratio de 3:1 provee buen parámetro inicial. Sin embargo, ratio de 8:1 ha sido usada exitosamente.

11.3. ANEXO 3. Protocolo de transformación de bacterias quimiocompetentes

1. Añadir 50 ng de la ligación por 100 µL de células quimiocompetentes, mover el tip suavemente para una mejor mezcla (no pipetear). Dejar los tubos de microcentrifuga con las bacterias en hielo de 20 a 30 minutos.
2. Realizar un shock térmico a las bacterias, transfiriendo los tubos eppendorff a un baño María a 42° C por 90 segundos.
3. Rápidamente transferir los tubos a hielo y permanecer las células ahí por 1 ó 2 minutos.
4. Agregar 700 µL de medio LB a cada tubo de microcentrifuga con bacterias. Colocar dichas bacterias en un baño María a 37° C con agitación por una hora.
5. Agregar el volumen adecuado (100 ó 200 µL) de bacterias quimiocompetentes transformadas en una placa con medio LB agar con el antibiótico apropiado.
6. Invertir las placas e incubarlas a 37 °C. Las colonias transformantes deberían aparecer en 12 ó 16 horas.

11.4. ANEXO 4. Preparación de *E. coli* quimiocompetentes

Preparación de células

1. Preparar tampón Inoue de transformación (se debe de colocar a 0° C antes de su uso).

Para mejores resultados, preparar este tampón con agua obtenida directamente del servicio de filtración Mili-Q.

a. Preparar 0.5 M de PIPES (pH 6.7) (piperazina-1,2-bis[ácido 2-etanosulfónico]) disolviendo 15.1 g de PIPES en 80 ml de agua Mili-Q. Ajustar el pH de la solución a 6.7 con KOH 5M y luego añadir agua Mili-Q hasta obtener un volumen final de 100ml. La solución se esterilizará por filtración.

El PIPES se irá diluyendo mejor a medida que va llegando al pH arriba indicado.

b. Preparar el tampón Inoue de transformación disolviendo todos los solutos indicados abajo en 800 mL de agua Mili-Q y luego añadir 20 ml de PIPES 0.5 M (pH 6.7). Ajustar el volumen del tampón a un litro.

Reactivo	Cantidad por litro	Concentración final
MnCl ₂ ·4H ₂ O	10.88 g	55 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.20 g	15 mM
KCl	18.65 g	250 mM
PIPES (0.5M, pH 6.7)	20 mL	10 mM
H ₂ O	A 1 litro	

c. El tampón Inoue de transformación se esterilizará por filtración.

2. Colocar una colonia bacteriana (2-3 mm de diámetro) de una placa que ha sido incubada en medio SOB agar por 16 a 20 horas a 37C (se puede dejar overnight).

Transferir la colonia en 25 mL de medio SOB medio líquido en un matraz Erlenmeyer de 250 mL (esto debe hacerse cercano a las 8 am) Incubar el cultivo por 6-8 horas a 37° C con una agitación vigorosa (250-300 rpm).

3. Alrededor de las 4 de la tarde, se usará este cultivo inicial para inocular 4 matraces Erlenmeyer de 1 litro, cada uno conteniendo 250 ml de medio SOB. El primer matraz recibirá 10 mL del cultivo inicial, el segundo recibirá 6 mL, el tercero 4 mL y el cuarto 2 mL. Incubar todos los frascos toda la noche a 18-22 °C con agitación moderada.

4. A la mañana siguiente, leer la densidad óptica a 600 nm de longitud (OD_{600}) de los 4 cultivos.

5. Cuando el OD_{600} de uno de los cultivos alcanza 0.45-0.55, colocar el matraz con el cultivo en hielo por 10 minutos. Descartar los que obtengan un OD_{600} más alto. La temperatura en muchos laboratorios incrementa durante el día y disminuye en la noche (el número de grados depende de la estación del año, el número de personas trabajando en el laboratorio en la noche, etc). Debido a esta variabilidad, es difícil predecir la velocidad al cual los cultivos crecerán en cualquier noche. Usando 4 diferentes inóculos, se incrementa las chances que uno de los cultivos será el de densidad correcta después de la incubación por toda la noche.

6. Centrifugar las células por 10 minutos a 4000 rpm a 4° C.

7. En una cámara de flujo laminar, eliminar el medio y colocar la botella de centrifuga abierta boca abajo en papel toalla por 2 minutos.

8. Resuspender las células suavemente en 80 ml de tampón Inoue de inoculación frío.

Las células son mejor suspendidas por agitación suave que por pipeteo o vórtex.

9. Centrifugar las células por 10 minutos a 4000 rpm a 4° C.

10. En una cámara de flujo laminar, eliminar el medio y colocar la botella de centrifuga abierta boca abajo en papel toalla por 2 minutos.

11. Congelamiento de células competentes

- Resuspender las células suavemente en 20 mL de tapón Inoue de transformación.
- Añadir 1.5 mL de DMSO (7% de concentración final). Mezclar la suspensión bacteriana por agitación suave y luego colocarlo en hielo por 10 minutos.
- Dispensar rápidamente la solución en alícuotas de 100 μ L en eppendorff de 1.5 mL estériles con tips previamente enfriados a -20° C o si se prefiere en nitrógeno líquido justo antes de su uso. Inmediatamente enfriar las células competentes inmergiendo los eppendorff cerrados en nitrógeno líquido y luego dejarlas en hielo hasta acabar de alicuotar. Almacenar los tubos a -70° C una vez terminado. Enfriar en nitrógeno líquido mejora la eficiencia de la transformación 5 veces. Para propósitos de clonamiento, son adecuados unas alícuotas de 50 μ L de la suspensión de células competentes.

11.5. ANEXO 5. Medios de cultivo

Los medios LB y SOB fueron usados para el crecimiento inicial bacterias.

Medio LB (Luria-Bertani)

Por litro

A 800 mL de agua Mili-Q, añadir:

Tryptona (DIFCO) 10 g

Extracto de levadura (GIBCO). 5 g

NaCl (MERCK) 10 g

Agitar hasta que los solutos estén disueltos. Ajustar el pH a 7.2 con NaOH 1M. Ajustar el volumen de la solución a 1 litro con agua Mili-Q. Esterilizar por autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (1.05 kg/cm²) en ciclo líquido.

Medio SOB

Por litro

A 800 mL de agua Mili-Q, añadir:

Tryptona 20 g

Extracto de levadura.... 5 g

NaCl 0.5 g

Agitar hasta que los solutos estén disueltos. Añadir 10 mL de KCl 250 mM (esta solución es preparada disolviendo 1.86 g de KCl en 100 mL de agua Mili-Q). Ajustar el pH del medio a 7.0 con NaOH 1M. Agregar 10 mL de MgCl₂ 1M (esta solución es preparada disolviendo 38 g de MgCl₂ en 90 mL de agua Mili-Q). Ajustar el volumen de la solución a 100 mL con agua Mili-Q y esterilizar autoclavando por 15 minutos a 15 libras de presión (1.05 kg/cm²) en ciclo líquido). Ajustar el volumen de la solución a 1 litro con agua destilada. Esterilizar por autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (1.05 kg/cm²) en ciclo líquido.

Medio LB o SOB agar

Cada litro de medio LB o SOB líquido se pasará a 5 botellas de 200 mL, agregándose a cada una 3 g de agar-agar. Después se esterilizará en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (1.05 kg/cm²) en ciclo líquido. Una vez autoclado y enfriado, se debe guardar en un cuarto a 4° C.

Cuando se necesite un frasco, se licuará el medio con agar y cuando esté a la temperatura adecuada se agregará el antibiótico a utilizar de acuerdo al plásmido que se use.

11.6. ANEXO 6. Secuencias sometidas al NCBI

>NC_043447.1 UNVERIFIED: Potato virus B isolate Pasco-01 segment RNA1, complete sequence

```
TTGAAAAGATATTTTCAAACCTTTACTCTCAGGTAATCACGCTTGCTTCGCGCCGGATTAT
TTGACTTTTGTTTTTTGCTAGTCTTTCTCAATTACCGTTGATTGCGTTAAAATCATATTGAT
ATATTGGATAGCGCCAATATGCAAATTGGTCAAAGACCAACCCGAAACAAGGGATAGCGC
CCTTGCCTGATACTATGGATAGCGCCATAGTTTTACCTTATTGCAAATATAATAATAGTCT
TAATTTGTTTTTTTACCAAAATACTAATAGCACTATTAATTTAGATTTTGTTCCTTATTAT
AGTACTTTTAGTAATAATTTAAAAAAGCAAAATCTTTTTTTTATTTCTTTTAGATACAG
TACATCCTGATTTTCAGGAATAGTACTGTTAAATTTTCTCCCACTTATATCCAAGGTTCTTC
CATTTTTAAAAAATGGAAGAAAAGCAATGGTGGTATAACCACCATTTCTGCCTATACAGCA
CTCTTTTCCAGTTTCTGGTTAAGGGTTTGGGGGTTAACCATATCAGGATGAATGGGAAC
CTGTCTTGGCCAGCTGGCCAACCTTTGGCGGTTCACTTTTGAACGCATGCCAAAACGTGCA
TGAGCGCATGACAGAAGAGAGAGAGTACCGGCGTTTAGCCGAGGAGAGAAAGCAACTCTAT
CTGAAAGAGTTGGCTGCAAAAAAGCAGCTGCAGCCCGCAAGGCTGCTAGGGCCAAGAGAC
TAGCTTATCGCAAGCGTTTTTACGCTGTGCGTAAGTTGGTTATTGAGGCCAGAGTGCAACT
CATTGCACGTGCTTACCTGCAATTGCAGGCTAAACCAGTACCACCAACTAGTGCTGAGTTG
GAAGAGGCCAGGAACCTCTATAAAGAATTCCAGGCATATAGTCTGAAATATGCCCAATTTG
TTGCCACCAAGCGCTATCAGCGTAGGATGGCACAAGAAGAGAGAGCTGAAAAGCTCTTTCG
GGAAGTAGAGGCCCTTTTAAAAGAGCCTCTGAGAACTGTCGAGCCCGCTCCGAAGGTGGCT
CGTGCCGCTGCCCGAGAGGGTAGGAGGCAGCAACTCCATGGTATCCGCCAGGGTATCTTGG
AAAGCTTAAATGTGAGCCCTGGTTCCAAGGAATCATCTGAAAGGGCTATTGTTGCAGTTAT
TGCTGTGGCACCGCATTACCCCCGGCTAGCGAGCTCAATAGTCTCCTTTTTTACAGGAGCAT
CAAGTTCTGCTATCCAAGGGGTTTGCACCATTTCGGCATATTTATAGACAATATCTGTAAAT
TGGTGCGCTTTTATGATGAAGATCAACTCATCCAATCAATGTCAGAAATTAAGGATGAGGC
TAGGCTTCAAGAAGCCACTGTAGTCACATCTGGTGAATTACAGTTGATTGAGGATGCCGCT
CAAAATTCTAACGTGAGAGCGAGCGTTTTTCAAGAGAATCGCAGGGAAAATTAAGAAGTGC
TTTCCAATGCCTACTCTGGTGCAAAACAATTTTGTATGACATTGGAGAGGCTGCTGCTGA
AGGCGTGTTTCAAGTGTGGTCATGAAGTGCTTTCATGAAATGCTGAAATGCGTCAAACAAG
AGTTGGGCCTAGCGCATGAATTTATTGAAATGCTGATCAAAAAGGTCCGTGCATGGTATGATA
ATCTCATCAAGAAGATTGGTGATGCTATGTACACAATTGGGGTTTCTGGAATTATCGCCTT
AATGTTCTTATTGTGTCAAATGCTTACTTATTCGATAAATAAGCTATTGGGCGTTCCAGAT
CCTTTTTTTTTTGATGCAGATTTTCTCTGGGCTTTTTTTTTGCCTACTCTATGTGGGACAATA
AGTTACTACAGGGTGCTATGCGTGGTGAATTTATTGCATTGATAAACGAATTCATGCGCAA
TTTCTTTTCTCATGCGCAGAGCAGCAAAAAGTGGCGGCCAACCAAGCGGACCAGGAGGTA
CTCCAACGAATTGAACAAGGAGAACTTCCAACATTCGCTCCATACCGGTTGTCTCTGGTT
TAATTGAGGCCATCTCTGCTTTTGGCATGGGGCTCTGTAAGTTTCAGTCTATGAGCTTACT
TGAGGTTGGCAAAATGGCAGCTGCTCTACACCAATTGCGACTGGGAAAGGAAGCTCTGAAA
GAGTTTGTGAGTACAATCTTGCAATGTGTTGGCACAATTGCTGACAAAATTACAGGCCGGG
AACTACTTTTTTTTGATGAATTGTCAACCCTGGTATCTGTAGACGTGCGTGGCTGGCTTAA
TCGCGCACGGGGGATTCTGATGGAAGGGAACACACGGATCCCGGAAATCCAGTTTTTCGCT
ACAGTGGTGAATAAACTGGTTGTCGATGGTGACAAATTACAACATGGCATAAATGGTGTTT
CAAGAAAAATTTCTTGCGATTATGCCTCTCTCGTTGGTAGCGTGATGAAGGAAGTGCAGAG
ACTGCAAAAAAATATGCAGATCTGGTTGTACTGAGGGCCGAAGGAGAGAACCTGCCTGG
ATTTATGTCTGGGGAAAGCGACACTGTGGAAAATCCAATTTTCATGTCTGAATTGGGTATTA
GACTGTGTCAGCACTTTGATCTGCCATATACTGTTGCAAAATAGGAATATCAAAGATTTCATT
CTATTCATCCTATTTGGGTCAAACGATTATGCAGATAGATGATTTATCAGCCACCAAGACG
GAACCAGCCTTTGAGGGTGAGATGTTAAACCTTGTTTCATGTCAAGAACATCCGCTCAATA
TGGCTGACCTAGCTGATAAACCTATTTACTTCAGGAGTGATTTTGTATTACTTCTAGTAA
TCTGGAAGATGTGCCACCCAGCTGTGTGCGTGATGTTGAAGCGTATAGAGCACGCAAGTGC
```

TGTCTTATTGAAATGCGCCGTAAGCCTGGTGTGCAATTTGATCCTGATAATCCAATGACTG
CCTCCCAAATGAGATTGAAAGATCCTATGACGCAGATGTGTGAGGGTCCTGAGGCAGAGTC
ATGGATTGATATTGAGGATGGGATTACTGAAATTCTCAATAGAGTTGCTCGACATAGAGAT
GAGCAAGAGCGTCTTCAGCGTGCACATCTACGTAAGACTGCTGCAGTTGATCCTATGATTT
TGGCCGCTGAAAACCTTTCTACAAAGGAAAGTTGAAGAAGTGTACCTGCATTTCCCAAAAAT
CGAGCTTGAAAAGGCAGGCTTAACCTGTGCTGAGGGTAGAGGATTGTGTGTTGATGGATCA
CTCCTAATGCTTAATAGCAGATTTGAGATGGATGTTTCATACAGTGCATGATTCAAACTATG
CCAGATTGTGGGAAAAACGCACTATGGAACAATTTTTTCCAATGGTGCATGGCGGCACTTA
CCTAAATGGTAAGTCCCTGATAGTTACCGGATTCTACGTTCTCTTGTAATTCAGAATGT
AGTGTCTCGGCTTGGGTCAGTTAAGCAGTACTGCGACCTCATGCCAACAGAGGATTTTCC
AGCATTTGGGTTTGTGCGAACAAGCTTATTTACGATGTCTCCAGAAGCGTATAGACATGTA
TAATGCTGAGGTTGAATGCAATCCCTACTGTAATACTGCTTGGGCCAAAGTTCTAAAGGCC
ATGATGGCGACTAGGGATTTGATTATTGATAACGGCGGTGGAATGCTCATGATAATGGCTG
CCATCTTGGTTATCATAGTTAGTGCATGGGGTTTTTGGAAAGCACTTGGTCTTCTATTAC
TGGAACAATATCAATCGGTACTTTTTTTTTCCAGTGCAGCGGAAGCAGACCTTAAGAGTCAG
AGCAATTCCTTCAGGGATCGATCGTGTTATAGAGCTCGCAATATACCTGTAAATCATCGGT
ATGCCTATACACGATCCACTGAAAGTGATGGTATGTTGCCTGCAGCACGACTCTGCGTGGC
AATATATACTAGTGCTGGTGACTTTGTTTCAGCAATGCAATACAAGAATAAAAGTATAATG
CTGACAAGACATCAAGCTCTCCGATTTAGGGAAGGGGAAAGATTAACCTTAATCTATTCCA
CTGATGGAGAAAGGAAAATGGTGAATTGGCATCAATGTCATATGACTGAAATTCACCAATC
TGAGATTGTTCTTTGGACAGCGCCATCACTATCCCAGCTCCCACACCAATATGCAAACTA
TTTTTAGAGGATGCTGAGGTCGAGATGCCCTTGAATTTTAAGGCGATGGGTTATGTATTGA
GAAATGACAAGGATGGATAACCATTATGATACTCTCGATACATATGCTACAGTGGATAGAAC
CCCCTGCCGCTTAAAGACTTCTCCAGAGGCAACTGCTACTCTCATGAGATACCAGAGAAA
ATATCTTTCCATTATGAGGCACGCAACCATGACTGTGGCATGCTTATTTTGGCTAGGATAT
CTGAGCGCTACAAAGTAGTTGGTTTGCTTGTGGCAGGGAAGGAGAAAAACAAGTTGGGCTTG
TTTGTGCCCCAATCCACATATGGCTGAACTTAAAAGTTCTCTTGAATATCTTCCCGAATTC
GGTGAAGCTGAAGAGGGCTTTTCGAAGATTGGCTATGTTGACAAAAAGGATGCACCTGGCA
TTCCTAAGAAAACCGCTCTCGTGGCTGTTCCCGAAGCACTGTTAATACCTGTCAATGTACC
AATTAAAGAACCAGCCGTATTGTGTAGAGATGATCCTCGATGTCCAGAAGGGGTTGATCCG
CCAATGAAGGCCTTCAAGAAGAAGTTTACACAACCAATGCTGGAGCTTGAACAAGAACTTC
TCGATGAAGTGGCCATGGACATTTTAGAGACATGGTATGATTGTGAAGACCATGTACTTAG
TGATATACCATTGGAAGTTGCTATAAATGGTATACCTGCTGGATGTGAGGAGCAAGAACTA
GAGAATTTTGTGCTCAAAACGTCCCCCGGTTATCCCTACTTCAAGGAAAATAGGAAAACCC
ATACCAAGGGTAAACATGCCTATTTCCAGGAGGAAGAAGATGGGAGAATGGCACTAAAGAA
AACTCTCTTGCAGAAGATTTATACTTGAATCTACGAGATTTTACAAAGCAAGGAGTTCCA
GAACTGGTAGTGATTGAATGTCCCAAAGACGAACTTTTGCCAGTTCGCAAAGTTAAGGAAG
GGGCTTGCAGATTGTTTGAGATTATGCCTCTTCATTACAATCTCTTTTTTAAGGGAGAAAAC
TTGTGCGTTACACAATTTCTGCAAAATGAACGACATAAGTTGCCATGTCAGGTTGGTACA
AATCCTTATTCCAGGGAGTGGTCACACATATTTCAACGCTTAGCTAAGCGTAACAGTGTGG
CCATAAACTGTGACTATAGTGGGTTTGATGGCTTGTTAAATGCACAACCTTATTGAGACCAT
GGCTAAGATGATTAACAGATTATATGCTCTGAGTGGGGATACTGAATTATCTCAGGCTCAG
CGTTATAACATGATTATGGCTTTGCATGGTAGATATGCCTTTTTTAGGGCAAAAATTTACA
AGGTGAATGCTGGGTTACCGTCAGGATTTGCTTTAACAGTGGTGAATTCCTTTTTCAA
TGAGATCTTGATTCTGGTATGCTTTTTAAGGTACTTGCGCCCCAACCAACGGAATTTTTTT
GGATTGCATGTTACATTATTGGTATATGGTGAATGACAATCTCATTTCAGAACACCAACTG
TTGAGTGGTTCACTGGTGAAGCCATTCGATGCACACTGGCCAAATATAAAGTTAAAATTAC
AGATGGATCTGATAAATTGGCCTTGACCATCGAAGAAAAGCCATTGTCTGAATTAGATTTT
CTGAAGCGAAAGTTTTTGAAACTAACACTGGTGTATACAAGCTCCACTTGATAAGAGCG
CCATCTATTCTTGCTTCACTGGCTTGTTACCATCTAAGGGAAAGAAGGTGGATGGTGGACC
TCTAGATGTTGTTGAAGAACTCATCCTAAATGTGAATGTTTCTCTAATGGAATTGTATCTC

CATGATGATAGAGATGAGTTTAATTCGGTGAGGCAATTCTATTTGAAAAGATTGCCAATGC
AGGCTGATTTATTTAGAACCTGGGCTATGTGTGAGAGTTTTCACAGTTCCCAACAACTGG
TTTCTTGAAATATGATCCAGCCAAGGTTCTAGATATCCATATTGCTCCTGGTATGTCTAAA
TTCCTGCACTGTTCTGGAGAGGGCAAAGCGTGTACAGGTATACGCCAACACTCGCAGTAT
GTGGACCACACTACCATTGCAACAAAGATGAATTTTGTGTATCCACGATACCACTTAAGCC
TGGAGAGGATGGGTGTGTTATTCCTGTAACGAGTGGAGCTGGTGTCCGTGGCTTGCCTACG
AAATCATGGGTGAATGCCTTTCGATCGCCACGAAAGCTCAAAAACCAAGAGGGATATCAGA
TTTATTCGTTTCATGCTTGGCGCTATTGAGGCTGGTAAGACTCTGATTTTCAAATCGCCAGC
TCCATATGTTGCTGGGAATGCAGCCCTGATAGCCTTTGCTGATGGGGCAAATTTGGCACGG
CAACAGGACCTACTATATCATTATAGAAATTCAAATCCAGAGAATATGAATGGACTTGAAC
AATATTTTGGATGCGCCATTACCAAGTGCCACCATTGGTAAATTTTGGTTTTCAAATGCTGA
AACATATGCTAACCTTTGCCACCGGAAGGAAGGGGAGGTTGCAGACATTAATACAGCAACT
GTTACAACAGATTTAAATGCCATGAGCAAGTTGGGTAAAGTCCCAGCGATGAGTGCTCGGT
CATTACAGGTCGAAGTTTACAGTTGCCTTGGCCTGTAACAAGAACATGTGTCCACATCATAA
AGCCACACAGGACACAATGGATAAAGCCTTTGATGTGGTATGGAGCCAAAAGTGTAAGACC
TCAAATGTCAAGTTAGTGATAAATTTGGTCTTAAACAATGAACTGATTCATTGTAAAT
AATTCAGTCGATTTTCTATGATCGTAATCTCATAGTTTTGTAAACATTTTCTTGTTTTCTA
AATTAGAATTTATTTTCTGTTGTTTGTTTAATTACTGTTTATCAGTGGCGATGAGATAGGT
TTGTCCTTTTCTATTTCTGCTTTGTTGGACACAAAATATGAATTTTACTTTTGTAAAGTT
TTCCTATGCAG

**>NC_043448.1 UNVERIFIED: Potato virus B isolate Pasco-01 segment RNA2,
complete sequence**

TTTCAATTACCGTTGATTGCGTTATAATCAAATTGAGTTATAGGATAGCGCCTATAAGATC
TGATCGATAGGATAGCGCCTATCTTCTTTCATATTATTTACATTATTACTACTTTAATTTT
GAATCAAATCTTTTTTCCAAATTGAACATAAAAAGAAAATATTCTAAATTTAAGTTTATTT
TGTTAATAATCTTAATTCTGTGGAACCTCTGAATGGGTTTCTTGGAGCTTTTTAGCTCAGAG
GCCGGGCGTTTAGCTCGTGCCAAAGCTGAAGCCCTTGGTAGAACCAAGGCCATTTGCAACT
ATGCGGTTGCATTTGCACAGTCTCTTGCAAAAGGGACTCGAAAAAATTTCTACTGTTCCGT
CTGGGAGCAGATCGATTCCACTATGGAATTGGTGCCACTATCTGAGGTGGTAGAAAGGGTT
GTTCCCAGCTGGGTTCAACCAGTGAAGAGTCATTCATTTGGCTCGTTTTCATTTGGCAGGA
ATTACTGTGCTGCGGTGGTATTAAGCCCACTGCGGAAATGGTGGATCTTGTGAGTGCTCT
CACGGTTTCCACCTTGAGTTCTCCGCTCAATAAACAGGAGAGGAGGAAGTTGCGACGTAAA
CGTTGCCCTTTCTCCACCACTGTTTGCAGGCCAAATTCAATTGATGCCTGCCACCTCTGTG
ATCAAATCCAGAGGTATGAAGTCAACCAGGAGGCTCCACAACCAGAGGAGTGTCCACACTG
TTTGGGAACCTGGTATTGTGTGTTCTAAAGAGTGGGATCTTTTGCGCACAACGGTTAGGGAA
AACCGTAAACTTTCCAAGTTCCTTCACTGCCCTTGCATGAACATGTTTTGCAGGAGGGTT
TGCCCGGTGCTTGGCGTTATAGGTCTCGCATTGGATATGTCAGTAAAAGCATCCTATCAC
TGATGTAAATACATGGATGCAGGCTGCTGCTATTGTGCGTTCAGAGCCAGATTTCTGGATG
CGCACCGATGACCCTTACTTACAGAGGGACATCATTAGTGGTGGTGGATGGAGGTTACGACC
CATGGTGTTATATAGCACCGACTAAGCACATTTGTGCCAAGATTTTTGACTGGTGGCACAC
AAAGTATACACCAGGATATGACTGTCCAAATCCATCTTTTGATGATTTTGACAGGAAGAAA
ATGGGGCCTCCCAGATGGCCACTCTATAATTATGAGAGTGCACGCACTACCCAGCGTGAGA
TGGTCCACACTGTCCCGAAGGGTGATACTGATTATTTCAACTACTGTGTAGGTGCTCTATC
CTCAGAGTTTGAATTTTTTCTGGATGAGTTCTATGATTGCGCTTCCACATTTGATGGTGAA
TTGAACTTGTCAATAGGCAATGTATCTCAAAGGCCATATCGAGCCTACTTCGAAACTTCAA
GATTGAAAGTTTCTATAGTGGATAAGATATATCTTGCAGATGCCTATAAGATGGTACACTG
CCAAGAACCGGTGCAGGTTATGGCACACGGCCGAGATGAGGCTGAGGACCAACTTGACCAT
CTTGAAAATAAGCAAGGTGGTGAAATCTTTTCAACCCCAACTTCATTAACATGCTTAAAT
CCAAGAAGAAGGAGGTTAGAGGCAAGGATTTTGCTGGTGCAACTGAGGGGCGTATAGTCAG

ATCTGCAGATTTAGAACTCAGTAAGCAAGACATATTCCTCACAAATTCTCTCATGGAGAAA
ATGCGCAAGTCACGCATTATTAAGAGGTTTGCTGGAATGTCGCCACTTCTTACACGGATGA
ATATGGACATAACCAATAAAGATGAAATTGTCAGATATCCCGTTAAGGAGTTGCAGTGTAC
CATTGATGGTACTTTATCCGCACAACTTTACAGTTCTGGAAAGACCCAGGGAGTCACTA
ATATGTAAAATGAGTGAAGAGGGTTGGAAGGAGGCAAAGTCTGTTTGTCTCAATCTACATG
TGCGGAGTTATCTTCCCACACATGTACGTGTATATGCGTTTTGTGTGGTTATGTGGGGCCA
TTCTAGCAATGCTGAAGTTGCTAGTCTGAGTGGATCATATCTCTATTTGGGAGATGGCGAA
GCTTCAATGCTTCAACTGCCACTTATTTGCAATCCACTTGGTAATGAGTTGCAGGACCAAG
ATGCCTATAGAAGGTCATTGGTTCTTTCTACGAGTTTTTTTTGGACCAACCGGTTTTAAACC
TGGTCAACCCATATTCGGTATAACTGCAGTGGAAATTTACCGAGTATATGCCACGTACAC
GGGGGCATCTCCCATGAGCAAGATTCATGGGATAAAATGCTACAGGCACACCAGGGACCCA
ATAAGCAAAGATTTATAAGTGGGTATAATGTTGTGGATGTGATAGAGTCTGGAGCTGACAA
AGCTGTCAAGTTTCCAGAGTTTGATATGTCTGCAGTACCAAATCATCAGCCGGTAGTGAGA
AAATTTAATGATAAGGTTGGTGTTTTAGGGATCCAGCGATCTACCAGTATGCGGGTTAAAA
ATTTTTCCAAGTATGCTGGTGGAAATATTCCTGTGGTGAATCACTTTGATTATACACAGAA
TATTGCTTCTGGTGTGGAGAATCTGACAGGAAAAGTGCAGATATCGTACATGATCCAATA
TTGCAGACCATTTCAACAGTTCTTTTGAAAGACGCTGGCAAAGATACTAATTGTTTTGCTA
GTGATCTAGGTCCAATGGAATATATTGGCACAGAAATGTGTGTTATGCCCCCGGAGGCTCG
TGCTGGTCACATCATGCGGAAAATTCCACTTATGGACACTTTCCGTGAGTCCAGGGAAGT
GCGTATAATCGATGGCTGAACCTTGGTTATATGGACTGTGATATTGCCCTTGTTAGCCATT
TGGCAGGCAATGTTTATAGTGGTGTCTGTGATTTTCGTACTTGATTGCTATAATCGCTT
ACCAGAATCACTATCTACGGAACTTTTATGTCTCAGATAACACAATTTCCATTGTTTATA
CACATGTTATCAGATAATAAACTTCCACACATGTTATACCACTGAGAAAAATTGTTGGAC
ACACACTGCATGTTGGTGGGGATGCTTTTGCAAACCCAATGTTGTATGTTGTTTGTGGGTC
TCGAGCCTCGCTCCCTATCTCAGTTGATGGCCACTTTGACATTGAATTTTACACTAGTGGT
CCATTATATGACAATGCCGGTTTTGCACCTGATAGTCTGTTGCAATATCCTATCACTGATA
AATCTCTTGAAGATTTAGATATTGTATTGCCAACAAGGATTATTGGCATTGGCAGTGCCGC
CCCCACTTCATTTCTTTGAGTTGGGCACTTCCACGAAGTATCATGGATTACCTCCTAC
TCTTTTGGATCAGCCATACTGTCCCACTTTCTTGGTGTGGCAGGAACCTTGGATTTTACTC
TCTATGTTGTATCATCAGTTTTTACATCTTGCAAAGTATGAGAGTATTACTATGGAATTCATT
GCCTAGCAATTTATTCCTTCCCCGTATACCACATATTGATGTGGAGTCACGAACCCAGCGT
ATGCAACTTCGTATACAAGACCCATTTGTGAGCTCTTCCACTTTTGGCGATACAGGTGCAC
AATTAATTGTTGTTCTCTTTGCACAGTATATACACCAGAACATGTGGAATCCGCATTTGA
ATTTGGGATCACCATTTCATGGGATTGTCCCAGATAGCAAAGTGTGCGATCGATAAATTAC
ACCAATAAGTTTGCTTGGTTTATGATGAAGGTTAACACACCATCTGGGATGACTGCTGTGG
ACATTCCAGCACGGTGTGTAAATCTTAAACATACCGCTGCAACATTTCAACACTTTGTGAA
TCCTTTTACCACATTGTGTTTCGGCTACAGGCTTGCATGGTGGTGTGTTGTTCTACACTTC
TATTGGTCTTTGGATAAGTCAAGAAAGAAAATGTCTGACTTGACTGGAAGTGTAGTTATTT
CCTCTGGTATGGGTGTCCCAACTGATTTCTTTAGGGGTGGGATACAGATCTTCAACATGCT
TGAGTGTAAAGGCTTCTATACCGATCCAATTCGGCACCTTTTCTGGTGTGGCACCTTCCACT
GCCCCCAATCATGTTTCAATTTAAATTGGGTTCGATTTGCACTTGATGGTGGTGGGAAATTTT
TTAATACACTCCATGTCTCTGTTGAGGTCTTGCCTGGGTTTTCTTTTTATGGTAGGACGGC
CGGACCTTTCTCTCCAATTAGTGGTGTGCTGATACTAAAGCACTCATTAAGAGGAGATG
GATAAAAGAAAGAGTAGGACCAAGAAAGGGGGATCAGCAGATGATACTAGTACATCTTAAA
ACAACTAGTCGATTTCTATGATCGTAATCTCATAGGCTTGTAGATATTTTCTTGTTTTT
TATATTAGAATTTATTTTCTGTTGTTTGTTTAATTACTGTTTATCAGTGGCGATGAAATAG
GTTTGTCTTTTCTATTTCTGCTTTGTTGGACACAAAAATACGAATTTTACTTTTGTGAA
TTTTCTTATGCAG